

**Das Methylierungspotential temperenter B. subtilis
Phagen :
Ein Vergleich der genetischen Determinanten
und ihrer Produkte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Mario Noyer-Weidner
aus
Hof/Saale
Berlin, 1984



Das Methylierungspotential temperenter B. subtilis Phagen:
Ein Vergleich der genetischen Determinanten und ihrer
Produkte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie (23)
der Freien Universität Berlin
vorgelegt von
Mario Noyer-Weidner
aus
Hof/Saale

Berlin, 1984

1. Gutachter: Professor Dr. T. A. Trautner

2. Gutachter: Professor Dr. E. R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. April 1984

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin-Dahlem in der Zeit von Januar 1981 bis Januar 1984 angefertigt.

Herrn Professor Dr. T. A. Trautner danke ich für die Themenstellung, seine freundliche Betreuung sowie viele hilfreiche Gespräche. Frau Dr. U. Günthert, Herrn Dr. A. Iglesias und Herrn Dr. S. Jentsch möchte ich für die gute Zusammenarbeit und zahlreiche Anregungen danken. Frau Dr. G. Morelli und Frau M. Kamke danke ich für elektronenmikroskopische Aufnahmen. Herrn R. Tailor gilt mein Dank für technische Hilfe bei den Minizellexperimenten.

Herrn Dr. A. Kiss danke ich für die freundliche Überlassung der Plasmide pSPR5, pSPR7 und pSU15.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Abteilung Trautner, insbesondere bei Frau R. Bachman, für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken.

1.	<u>Einleitung</u>	6
2.	<u>Material und Methoden</u>	10
2.1	Abkürzungen	10
2.2	Chemikalien	11
2.3	Enzyme	12
2.4	Bakterien, Phagen, Plasmide	13
2.5	Medien, Platten, Puffer	15
2.6	Phagenlysate und Phagen DNA Präparation	16
2.7	Phagenneutralisierung durch Antiseren	16
2.8	Transfektion kompetenter <u>B. subtilis</u> Zellen: Marker Rescue (MR) Experimente	16
2.9	Plasmidisolierung	17
2.10	Transformation mit Plasmid DNA	17
2.11	DNA Restriktion und Ligierung	17
2.12	Agarosegelelektrophorese	18
2.13	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	18
2.14	Radioaktive Markierung von DNA <u>in vitro</u>	18
2.15	DNA/DNA Hybridisierung, Autoradiographie	19
2.16	Minizelltechniken	19
2.16.1	Isolierung von <u>E. coli</u> Minizellen	19
2.16.2	Radioaktive Markierung plasmidcodierter Proteine	20
2.17	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Fluorographie	20
3.	<u>Ergebnisse</u>	21
3.1	Das Methylierungspotential der Phagen <u>Z</u> , <u>SPR</u> , <u>SPB</u> , <u>ø3T</u> und <u>rho 11</u>	21
3.2	Genetik der <u>SPR</u> und <u>ø3T</u> Mtasen	24
3.3	Rekombinativer Austausch der Mtase Gene heterologer Phagen	28
3.3.1	Quantitative Analyse von Rekombinations- ereignissen	28
3.3.2	Qualitative Charakterisierung der Rekombinantenphagen	32

	<u>Seite</u>
3.4	Strukturelle Homologie Mtase codieren- der DNA Fragmente 36
3.5	Die Position der Mtase Gene im Genom der Phagen SPB, ø3T und rho 11 41
3.6	Klonierung des ø3T Mtase Gens in <u>B. subtilis</u> 44
3.6.1	Konstruktion eines SPP1/ø3T-Hybrid- phagen 44
3.6.2	Methylierungspotential des Hybridphagen SPP1v31 45
3.6.3	Restriktionskarte des Hybridphagen SPP1v31 46
3.6.4	Anmerkungen zur Stabilität des Vektors SPP1v 53
3.7	Klonierung der ø3T, rho 11 und SPB Mtase Gene in <u>E. coli</u> 55
3.7.1	Konstruktion der Rekombinantenplasmide 55
3.7.2	Restriktionskarten der Rekombinanten- plasmide 56
3.7.3	Methylierungspotential der Rekombinanten- plasmide 57
3.8	Lokalisierung des ø3T Mtase Gens inner- halb der in SPP1v31 und pBN16 klonierten Fragmente 60
3.9	Hybridisierung Mtase codierender Rekombi- nantenplasmide 64
3.10	Klonierbarkeit Mtase codierender DNA Fragmente in <u>E. coli</u> Plasmidvektoren 67
3.10.1	Stammespezifische Toleranz Mtase exprimierender Rekombinantenplasmide in <u>E. coli</u> 67
3.10.2	Isolierung eines Mtase toleranten Derivats des minizellproduzierenden Stammes DS410 70
3.11	Expression der SPR, SPB, ø3T und rho11 Mtase Gene in <u>E. coli</u> Minizellen 71
4.	<u>Diskussion</u> 75
5.	<u>Zusammenfassung</u> 88
6.	<u>Literaturverzeichnis</u> 90

1. Einleitung

Postreplikative DNA-Methylierung findet sich in einer Vielzahl pro- und eukaryontischer Organismen. Zahlreiche Befunde der letzten Jahre deuten einen Zusammenhang zwischen eukaryontischer DNA-Methylierung und Genexpression an, wobei eine inverse Korrelation zwischen Methylierungsgrad und Transkriptionsaktivität eines Gens besteht (Übersichtsartikel von Razin und Riggs, 1980, und Doerfler, 1983). Daß auch prokaryontische DNA Methylierung prinzipiell die Genexpression beeinflussen kann, zeigen Untersuchungen, die die Expression der DNA modifizierenden (mom) Funktion des Phagen Mu zum Gegenstand haben (Hatman et al., 1982; Kahmann, 1982): Adeninmethylierung ist - in diesem Fall als positives Kontrollsignal - in die Expression des mom-Gens involviert. Eine weitere gut charakterisierte biologische Funktion der DNA Methylierung in E. coli betrifft die Strangerkennung bei postreplikativen Reparaturprozessen (Glickman und Radman, 1980; Lu et al., 1983; Pukkila et al., 1983). Darüber hinaus werden Einflüsse der DNA Methylierung auf Rekombination (Korba und Hays, 1982a und 1982b) und Replikation (Billen, 1968; Lark, 1968; Lark, 1979) diskutiert.

Am längsten bekannt und biochemisch am besten charakterisiert sind jedoch Methyltransferasen, die bakteriellen Restriktions/Modifikations (R/M) Systemen (Arber, 1965) zugehörig sind. Die restringierende Aktivität dieser Systeme, die in nahezu allen bakteriellen Spezies gefunden werden (Roberts, 1983), schneidet DNA entweder innerhalb oder außerhalb einer für das jeweilige System charakteristischen Erkennungssequenz. Sie stellt somit einen Schutzmechanismus gegenüber dem Eindringen doppelsträngiger heterologer DNA dar. Die Restriktion zelleigener (homologer) DNA wird durch die modifizierende Aktivität verhindert. Sie methyliert spezifische Adenin- oder Cytosinreste innerhalb der Erkennungssequenz des R/M Systems und verleiht der DNA auf diese Weise Resistenz gegenüber cog-

naten Restriktionsenzymen (eine Übersicht über die verschiedenen R/M Systeme bieten Artikel von Yuan, 1981; Bickle, 1982, Modrich und Roberts, 1982).

Restriktionsendonukleasen und Modifikationsmethyltransferasen haben jedoch nicht nur auf Grund ihrer unmittelbaren biologischen Funktion Beachtung gefunden. Sie stellen auf Grund ihrer sequenzspezifischen Interaktion mit DNA auch interessante Objekte für Studien von Protein-DNA Wechselwirkungsprozessen dar (Übersicht in Modrich und Roberts, 1982). Die Interferenz von DNA Methylierung mit der Funktion von Restriktionsendonukleasen ist dabei selbst einer der bestuntersuchten Effekte von DNA Modifikation auf Protein-DNA Interaktion.

Sowohl in Bezug auf seine biologische Funktion als auch unter dem letztgenannten Aspekt scheint das Modifikationspotential einer Gruppe temperenter B. subtilis Phagen (Tabelle I faßt die wichtigsten bisher charakterisierten biologischen Eigenschaften dieser Phagen zusammen; einen ausführlicheren Überblick geben Artikel von Rutberg, 1982 und Zahler, 1982) von besonderem Interesse: Es stellt zum einen einen neuen Typus phagencodierter Antirestriktionsmechanismen (Übersichtsartikel von Krüger und Bickle, 1983) dar. Die Phagen SPR, SPB, ϕ 3T und rho 11 verhindern Restriktion durch das bakterielle BsuR-System (Trautner et al., 1974) durch Expression BsuR spezifischer Mtase Aktivitäten (Trautner et al., 1980; Cregg et al., 1980; Noyer-Weidner et al., 1981; Noyer-Weidner et al., 1983). Da weitere phagencodierte, sequenzspezifische Mtase Aktivitäten identifiziert werden konnten (Jentsch et al., 1981; Noyer-Weidner et al., 1983; Günthert, unveröffentlicht), die nur teilweise mit antirestriktiver Funktion erklärt werden können, stellt sich zudem die Frage, ob die Phagen Mtasen noch weitere biologische Funktionen erfüllen. Das mehrfache und teilweise unterschiedliche Methylierungspotential der Phagen dieser Gruppe begründet darüber hinaus das Interesse an der Biochemie und genetischen Determination der entsprechenden

Tabelle I: Biologische Eigenschaften der B. subtilis Phagen Z, SPR, SPß, ø3T und rho 11.

Eigenschaften	Phage					Referenzen
	Z	SPR	SPß	ø3T	rho 11	
Kreuz- reaktion gegen	-	+	-	-	-	Dean et al., 1976 Warner et al., 1977 Hemphill et al., 1980 Noyer-Weidner et al., 1983
	+	-	+	+	+	
Homoimmunitätsgruppe	SPß		ø3T			Dean et al., 1976 Hemphill et al., 1980 Noyer-Weidner et al., 1983
	+	+	+	-	-	Hemphill et al., 1980 S.A. Zahler, pers. Mitteilung
Konversion Thy auxotropher Mutanten zur Prototrophie	+	+	-	+	+	Tucker, 1969 Dean et al., 1976 Warner et al., 1977 Hemphill et al., 1980 S.A. Zahler, pers. Mitteilung
Sensitivität gegenüber <u>BsuR</u> Restriktion	+	-	-	-	-	Cregg et al., 1980 Trautner et al., 1980 Noyer-Weidner et al., 1981 Noyer-Weidner et al., 1983

Phagen Mtasen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zunächst, das Methylierungspotential der verschiedenen Phagen zu erfassen und einen Beitrag zur Beantwortung der Frage zu leisten, ob die mehrfachen Mtase Aktivitäten mit einem oder mehreren Genprodukten assoziiert, also an die Expression eines oder mehrerer Strukturgene gebunden sind.

Ein zweiter Schwerpunkt betraf die Evolution der Mtase Gene. So sollten zum einen potentielle Mechanismen, die zur Verbreitung der Mtase Gene innerhalb dieser Phagengruppe geführt haben könnten, untersucht werden. Zum anderen sollten die genetischen Determinanten isoliert und ihre strukturelle Beziehung zueinander und zu Mtase Genen von Wirts R/M Systemen analysiert werden. Die Frage nach konservierten Strukturen innerhalb verschiedener Mtase Gene schien auch im Hinblick auf die geplante Identifikation funktionaler Domänen der Mtasen von Interesse. Die Isolierung und Klonierung von Phagen Mtase Genen im homologen und heterologen Wirt bot darüber hinaus die Möglichkeit zu Untersuchungen, die die Expression der Mtase Gene betreffen.

2. Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

Amp ^{R/S}	Ampicillin resistent/sensitiv
Cm ^{R/S}	Chloramphenicol resistent/sensitiv
EtBr	Ethidiumbromid
i.c.	infective center
KB	Kilobasen
KD	Kilodalton
MC	Mitomycin C
5mC	5-Methylcytosin
MD	Megadalton
m.o.i.	multiplicity of infection
MR	marker rescue
Mtase	Methyltransferase
MW	Molekulargewicht
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
r ⁺ m ⁺	restringierend/modifizierend
r ⁻ m ⁻	nichtrestringierend/nichtmodifizierend
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
Tc ^{R/S}	Tetracyclin resistent/sensitiv
ÜN	über Nacht
WT	Wildtyp

Basensequenzen werden in 5' - 3' Richtung angegeben, wobei Großbuchstaben für Desoxyribonucleotide stehen.

2.2 Chemikalien

Acrylamid	BioRad, Richmond
Agarose	BioRad, Richmond
Antibiotika	Serva, Heidelberg
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Desoxyribonucleotid-	
Triphosphate	Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ficoll 400	Pharmacia, Uppsala
Lachssperm DNA	Boehringer, Mannheim
Methionine-Assay-	
Medium	Difco, Detroit
Mitomycin C	Calbiochem, USA
Nitrocellulose Filter	Millipore, Bedford
Radiochemikalien:	
[α - ³² P] dCTP	Amersham Buchler, Braunschweig
L-[³⁵ S] Methionin	Amersham Buchler, Braunschweig
SDS	Serva, Heidelberg
Sephadex LH60	Pharmacia, Uppsala
TEMED	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt, bezogen.

2.3 Enzyme

alkalische Phosphatase

(Kalbsdarm) Boehringer, Mannheim

DNA-Polymerase I Boehringer, Mannheim

DNase I Boehringer, Mannheim

DNA Ligase (T4) BRL, USA

Lysozym Serva, Heidelberg

Proteinase K Merck, Darmstadt

Restriktions- endonukleasen:

BglII

EcoRI

HindIII

HpaI

Boehringer, Mannheim

HpaII

MspI

SmaI

Fnu4HI

Biolabs, USA

HaeIII

BRL, USA

RNase A 

Sigma, München

2.4 Bakterien, Phagen, Plasmide

Bakterienstämme

B. subtilis

Stamm	Prophage	relevanter Genotyp	Referenz
ISB8	SPB	<u>BsuM</u> r ⁻ m ⁺ , <u>BsuB</u> r ⁺ m ⁺	Ikawa et al., 1980
ISC46	-	<u>BsuM</u> r ⁻ m ⁺ , <u>BsuC</u> r ⁺ m ⁺	Ando, pers. Mitteilung
ISE15	SPB	<u>BsuM</u> r ⁻ m ⁺ , <u>BsuE</u> r ⁺ m ⁺	Ikawa et al., 1980
ISF18	SPB	<u>BsuM</u> r ⁻ m ⁺ , <u>BsuF</u> r ⁺ m ⁺	Ikawa et al., 1980
SB1207 ¹	-	<u>BsuM</u> r ⁺ m ⁺	Zahler et al., 1977
TB804	-	<u>BsuM</u> r ⁺ m ⁺ , <u>BsuR</u> r ⁺ m ⁺	Trautner et al., 1980
TB106	SPR WT	lysogene Derivate von SB1207	Noyer-Weidner et al., 1983
TB104	SPR 19		Jentsch et al., 1981
TB102	SPR 26		Trautner et al., 1980
TB300	ø3T WT		Noyer-Weidner et al., 1981
TB311	ø3T 11		Noyer-Weidner et al., 1981
TB312	ø3T 12		Noyer-Weidner et al., 1983

E. coli

Stamm	Genotyp	Referenz
C600	F ⁻ , thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44, λ ⁻	Appleyard, 1954
HB101	F ⁻ , hsdS20(r _B ⁻ m _B ⁻) recA13, ara-14, Boyer und proA2, lacY1, galK2, rpsL20(Sm ^R), Roulland-Dussoix, 1969 xyl-5, mtl-1, supE44, EndoI ⁻ , λ ⁻	
DS410	minA, minB, rpsL, sup ⁺	Dougan und Sherratt, 1977

¹Da das BsuM System keinen Einfluß auf die Plattierungseffizienz der hier untersuchten WT und Mutantenphagen hat, wird der Stamm SB1207 im vorliegenden Text vereinfachend als r⁻m⁻ Stamm bezeichnet.

Phagen

SPR WT	Noyer-Weidner et al., 1983
SPR 19	Jentsch et al., 1981
SPR 26	Trautner et al., 1980
ø3T WT	Tucker, 1969
ø3T 11	Noyer-Weidner et al., 1981
ø3T 12	Noyer-Weidner et al., 1983
rho 11	Dean et al., 1976
SP8	Warner et al., 1977
Z	Hemphill et al., 1980
SPP1	Trautner et al., 1974
SPP1v	Heilmann und Reeve, 1982

Plasmide

Vektoren:

pBR 322	Bolivar et al., 1977
pBR 328	Soberon et al., 1980

Mtase exprimierende Rekombinantenplasmide

Plasmid	klonierte DNA	Vektor	Referenz
pBN 16	ø3T	pBR328	diese Arbeit
pBN 17	ø3T		diese Arbeit
pBN 18	rho 11		diese Arbeit
pBN 19	rho 11		diese Arbeit
pBJ 20	SP8		Jentsch, unveröffentl.
pBJ 21	SP8	pBR322	Jentsch, unveröffentl.
pSPR5 ^a	SPR		Kiss und Baldauf, 1983
pSPR7 ^a	SPR		Kiss und Baldauf, 1983
pSU15 ^b	<u>B. subtilis</u> R		Kiss und Baldauf, 1983

^aDas aus der Klonierung eines Mtase codierenden SPR DNA Fragments in pBR322 resultierende Plasmid wurde ursprünglich als pSU2 (Kiss und Baldauf, 1983) bezeichnet. Die Plasmide pSPR5 und pSPR7 enthalten das klonierte 4,5 KB Eco RI Fragment in definierten Orientierungen (Kiss, pers. Mitteilung).

^bpSU15 codiert für die Mtase des bakteriellen BsuR Systems.

2.5 Medium, Platten, Puffer

L-Platten, L-Medium (Luria und Burrous, 1957)

MMM-Platten, MMM-Medium (Palefski et al., 1972)

TY Platten (Rottländer und Trautner, 1970)

TY Medium (Biswal et al., 1967)

LTT Platten (Spatz und Trautner, 1970)

M9-Minimalmedium (Adams, 1959)

MIII-Medium (Spizizen, 1958)

HS und LS Wachstumsmedien für kompetente B. subtilis Zellen
(Rottländer und Trautner, 1970)

Phagenpuffer TBT: 0,1 M Tris/HCl pH 7,5; 0,1 M NaCl; 10 mM
MgCl₂

DNA-Aufbewahrungspuffer TE: 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA

DNA-Probenpuffer (6x) für Agarosegele: 15 % Ficoll 400; 0,25 %
Bromphenolblau

Protein-Probenpuffer (2x) für PAA Gele:

0,13 M Tris/HCl, pH 6,8; 4 % (w/v) SDS, 10 % v/v Glyce-
rin, 5 % (v/v) Mercaptoäthanol, 0,002 % Bromphenolblau

Laufpuffer für Agarosegele:

40 mM Tris/Acetat pH 7,9; 5 mM Na-Acetat; 1 mM EDTA

Laufpuffer für PAA Gele:

24 mM Tris; 0,2 M Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

Puffer für Restriktions- und Ligierungsansätze wurden nach An-
gaben der Hersteller angefertigt.

2.6 Phagenlysate und Phagen DNA Präparation

Phagenlysate wurden entweder durch Induktion lysogener Zellen (Titer ca. 2×10^8 /ml) mit MC (Warner et al., 1977) oder, im Falle virulenter Phagen bzw. virulenter Mutanten, durch Infektion (m.o.i. ca. 0,1 - 1) wachsender SB1207 Kulturen (Titer ca. 2×10^8 /ml) gewonnen. Phagen DNA wurde nach Trautner et al. (1974) präpariert: Die Phagen wurden über CsCl Gradienten gereinigt, die DNA anschließend durch mehrfache Phenolbehandlung extrahiert und nach Dialyse in TE Puffer aufbewahrt.

2.7 Phagenneutralisierung durch Antiseren

Antiseren gegen SPR und SPB wurden hergestellt wie beschrieben (Noyer-Weidner et al., 1983). Die Antiseren hatten K Werte von 250 pro min (SPR) bzw. 340 pro min (SPB). Zur Erstellung der Inaktivierungskinetiken wurden die Antiseren durch Verdünnung in MIII-Medium auf vergleichbare Aktivitäten standardisiert (siehe Abb. 4 oben). 10 µl der verdünnten Antiseren wurden mit 1 ml Phagenlysaten, die bereits vorinkubiert waren, bei 37° C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 100 µl Aliquots aus den Inkubationsansätzen entnommen, in 10 ml TBT (0° C) eingebracht und anschließend in geeigneter Verdünnung ausplattiert. Als Indikatorstamm diente SB1207.

2.8 Transfektion kompetenter B. subtilis Zellen; Marker Rescue (MR) Experimente:

Kompetente Zellen von B. subtilis Stämmen, die mit Mtase defizienten Phagenmutanten lysogenisiert worden waren, wurden nach Rottländer und Trautner (1970) hergestellt. Zur Durchführung von MR Experimenten wurden die Zellen mit 0.5 µg undegradierter oder restringierter DNA von WT oder Mutantenphagen transfiziert. Die i.c.'s wurden anschließend auf dem BsuR

r⁺m⁺ Stamm TB804 plattiert. Im Unterschied zu den Mutanten formen Mtase profiziente Rekombinanten auf TB804 Plaques.

2.9 Plasmidisolierung

E. coli Plasmide wurden ausgehend von 200 ml ÜNK plasmidtransformierter Zellen nach der "cleared lysate" Methode von Katz et al. (1973) präpariert. Mini-Präparation von Plasmid DNA erfolgte nach Birnboim und Doly (1979).

2.10 Transformation mit Plasmid DNA:

Transformation von E. coli Zellen folgte der von Brown et al. (1979) beschriebenen Methode. Transformierte Zellen wurden in L-Broth gezogen. Transformanten wurden durch Plattierung auf antibiotikahaltige L-Platten (100 µg/ml Amp; 100 µg/ml Cm; 10 µg/ml Tc) selektiert.

2.11 DNA Restriktion und Ligierung

In vitro Restriktion von DNA wurde unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen durchgeführt. Im allgemeinen wurden 2 - 3 Enzymeinheiten pro µg DNA eingesetzt. Die Ansätze wurden 1 - 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch 10 minütiges Erhitzen auf 68° C gestoppt.

DNA Ligierung erfolgte über 16 Stunden bei 14° C. Gewöhnlich wurden ca. 0,4 µg DNA in Endvolumina von 25 - 50 µl mit 0.5 Einheiten T4 Ligase unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen inkubiert. Vorbehandlung von Vektormolekülen mit alkalischer Phosphatase wurde nach Maniatis et al. (1982)

durchgeführt.

2.12 Agarosegelelektrophorese

Elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in 1 %igen Agarosegelen in TEP Puffer, dem EtBr (5 µg/ml) zugesetzt wurde. Es wurden Horizontalgele mit Abmessungen von 10 x 7 x 0,3 cm bzw. 10 x 20 x 0,4 cm benutzt. Die EtBr gefärbten DNA Banden wurden durch Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht sichtbar gemacht.

2.13 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach Agarosegelelektrophorese wurden die DNA Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und nach der Glasbindungsmethode von Vogelstein und Gillespie (1979) isoliert. Die isolierten DNA Fragmente wurden über eine Sephadex LH60 Säule von Agaroseresten gereinigt. Entfernung von EtBr erfolgte durch mehrmaliges Ausschütteln mit Isobutanol. Anschließend wurden die Fragmente gefällt und in einem geeigneten Volumen TE Puffer wieder aufgenommen.

2.14 Radioaktive Markierung von DNA in vitro

In vitro Markierung von DNA erfolgte durch Nick-Translation (Rigby et al., 1977). Im allgemeinen wurden ca. 200 ng DNA in einem Endvolumen von 100 µl unter Verwendung von [α -³²P]dCTP, DNase I und Polymerase I translatiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Proteinase K gestoppt. Die markierte DNA wurde von freien Nukleotiden durch chromatographische Auftrennung über eine Sephadex LH60 Säule gereinigt. Die spezifische Aktivität der nick-translatierten Proben betrug gewöhnlich ca. 10^8 cpm/µg DNA.

2.15 DNA/DNA Hybridisierung, Autoradiographie

Nach Agarosegelelektrophorese wurden DNA Fragmente entsprechend der Methode von Southern (1975) auf Nitrocellulose-Filter transferiert und gegen eine nick-translatierte DNA Probe hybridisiert. Alle Hybridisierungen erfolgten unter stringenten Bedingungen bei 65° C. Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Nitrocellulose Filter bei -70° C unter Verwendung eines Kodak X-Omat Röntgenfilms autoradiographiert.

2.16 Minizelltechniken

2.16.1 Isolierung von E. coli Minizellen

Die Minizellpräparation ging von 2 l ÜNK plasmidtransformierter Derivate des Stammes TC410 (siehe Abschnitt 3.11) aus. Durch Differentialzentrifugation nach Christen et al. (1983) wurde ein Großteil der Parentalzellen abgetrennt. Die verbliebenen Zellen wurden in 10 ml M9 Medium suspendiert, auf 10 - 30 % Sucrosegradienten (30 ml in Nitrocelluloseröhrchen) aufgetragen und für 20 min bei 4000 rpm im HB-4 Ausschwingrotor zentrifugiert. Während Parentalzellen unter diesen Bedingungen sedimentieren, befinden sich die Minizellen in der mittleren Zone des Gradienten. Sie wurden mit einer sterilen Einwegspritze abgenommen, durch Zentrifugation (10 min, 12000 rpm, SS34-Rotor) pelletiert und anschließend erneut in 10 ml M9-Medium resuspendiert. Weitere Anreicherung der Minizellen erfolgte durch Wiederholung der Sucrosegradienten-Zentrifugation. Die Konzentration der Minizellen wurde durch Bestimmung der OD₅₆₀ ermittelt. Kontamination der Präparation durch Parentalzellen wurde durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen auf L-Platten ermittelt. Im allgemeinen lagen die Werte nach 3 - 4 Sucrosegradienten-Zentrifugationen bei 1 Parentalzelle/10⁶ - 10⁷ Minizellen. Zur Aufbewahrung wurden die Mini-

zellen in standardisierten 1 ml Portionen (ca. 2×10^{10} Zellen) unter Zugabe von 10 % Glycerin eingefroren.

2.16.2 Radioaktive Markierung plasmidcodierter Proteine

Die konzentrierten Minizellen wurden aufgetaut und in 5 ml M9 Medium, dem zur Verhinderung des Wachstums parentaler Zellen Cycloserin (20 µg/ml) zugesetzt worden war, gewaschen. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (SS 34, 10000 rpm, 10 min) und in 500 µl M9 Medium (+ Cycloserin) resuspendiert. Zur Markierung der plasmidcodierten Proteine wurden 100 µl Minizellen in Gegenwart von 5 µl L-[³⁵S] Methionin (1450 Ci/mmol; 11,1 mCi/ml 1:10 in Difco-Methionine-Assay-Medium verdünnt) für 1 h bei 37° C inkubiert. Nach Sedimentation der Zellen (2 min, Eppendorf-Zentrifuge) wurde der Überstand entfernt. Die Zellen wurden in 1 ml H₂O bid. gewaschen, anschließend in 60 µl Probenpuffer (2x) aufgenommen und durch 3 minütiges Kochen bei 100° C lysiert. Das Lysat wurde für 2 min in der Eppendorf-Zentrifuge zur Abtrennung der Zelltrümmer zentrifugiert. 5 µl Aliquots des Überstandes wurden nach TCA-Fällung zur Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität benutzt.

2.17 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Fluorographie

Zur Auftrennung der markierten Proteine wurden 15 % PAA Gele nach Laemmli (1970) unter Einbeziehung der von Günthert et al. (1981) beschriebenen Modifikationen angefertigt. Die Proteine wurden in ca. 20 µl Probenpuffer aufgenommen und für 2 min auf 100° C erhitzt (Lugtenberg et al., 1975). Nach Fluorographie (Bonner und Laskey, 1974) wurden die Gele unter Vakuum getrocknet. Autoradiographie erfolgte bei -70° C unter Verwendung eines Kodak-X-Omat Röntgenfilms.

3. Ergebnisse

Ein Teil der hier dargestellten Ergebnisse, der die Genetik der phagencodierten Mtasen sowie Untersuchungen zur strukturellen Verwandtschaft der Mtase Gene betrifft, wurde bereits veröffentlicht (Noyer-Weidner et al., 1983).

3.1 Das Methylierungspotential der Phagen Z, SPR, SPB, ø3T und rho 11.

Die Phagen SPR, SPB, ø3T und rho 11 sind resistent gegen BsuR Restriktion in vivo (Tabelle I). Diese Resistenz geht auf die Wirkung phagencodierter Mtasen zurück, die BsuR Erkennungssequenzen GGCC innerhalb der Phagengenome modifizieren (Trautner et al., 1980; Cregg et al., 1981; Noyer-Weidner et al., 1981; Noyer-Weidner et al., 1983). Die DNA der WT Phagen erweist sich dementsprechend auch in vitro als resistent gegen HaeIII (Isoschizomer von BsuR) Degradation (Abb. 1). Weitere phagencodierte Mtase Aktivitäten verleihen SPR DNA Resistenz gegen HpaII und MspI Degradation (Jentsch et al., 1981), während die DNAs der Phagen SPB, ø3T und rho 11 gegen Fnu4HI Restriktion geschützt sind (Abb. 1). Die Expression der Fnu4HI (GCNGC) spezifischen Mtase Aktivität kann auch partielle Resistenz gegen PstI (CTGCAG) und PvuII (CAGCTG) Restriktion verursachen, da sich die Erkennungssequenzen dieser Enzyme überlagern können (Noyer-Weidner, 1980).

Im Gegensatz zu SPR, SPB, ø3T und rho 11 erweist sich der Phage Z in vivo als BsuR sensitiv (Tabelle I). Wie Abb. 1 zeigt, codiert er auch für keine der anderen hier beschriebenen Modifikationsaktivitäten. Seine DNA ist in vitro sowohl HaeIII als auch HpaII/MspI und Fnu4HI sensitiv.

Tabelle II faßt das Methylierungspotential der Phagen zusammen

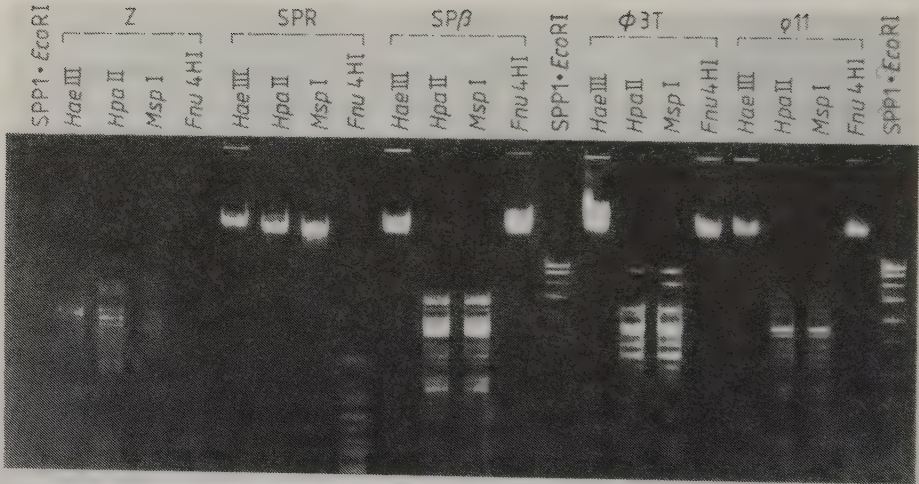


Abb. 1: Methylierungspotential der Phagen Z, SPR, SP β , ϕ 3T und rho 11. Gelelektrophorese der Phagen DNAs nach Restriktion mit HaeIII, HpaII, MspI und Fnu4HI. EcoRI verdaute SPP1 DNA diente als GröÖenstandard (Ratcliff et al., 1979).

Tabelle II: Methylierungspotential und 5mC-Gehalt der Phagen
Z, SPR, SPB, ø3T und rho 11

Phage	Methylierungspotential				5mC-Gehalt 5mC ($\frac{\%}{C+5mC}$)
	<u>BsuR</u> (G G C C)	<u>HpaII</u> / <u>MspI</u> (C C G G)	<u>Fnu4HI</u> (G C N G C)		
Z	-	-	-		0,13 ^b
SPR	+	+	-		1,37 ^c
SPB	+	-	+		1,76 ^b
ø3T	+	-	+		1,81 ^b
rho 11	+	-	+		1,65 ^b

^aDer 5mC-Gehalt von B. subtilis SB1207 DNA betrug 0,11 %

^bNoyer-Weidner et al., 1983

^cJentsch et al., 1981

und korreliert es mit dem 5mC Gehalt der Phagen DNA. Während die DNAs der selbstmodifizierenden Phagen SPR, SPB, ϕ 3T und rho 11 einen relativ hohen 5mC Gehalt aufweisen, zeigt Z DNA nur einen niedrigen 5mC Gehalt, der dem chromosomalen DNA des r^m-Wirtsstammes entspricht. Sollte Z überhaupt für eine Mta-se Aktivität codieren, so kann die entsprechende Modifikation nur wenige Erkennungssequenzen innerhalb des Z-Genoms betreffen.

3.2 Die Genetik der SPR und ϕ 3T Mtasen

Die Isolierung BsuR sensibler Mutanten von SPR und ϕ 3T hatte einen wesentlichen Beitrag dazu geleistet, die Resistenz dieser Phagen auf die Expression phagencodierter BsuR spezifischer Mta-se Aktivitäten zurückzuführen (Trautner et al., 1980; Cregg et al., 1980; Noyer-Weidner et al., 1981; Noyer-Weidner et al., 1983). Wie die weitere Charakterisierung dieser Mutanten zeigte, hatten sie mehrheitlich auch das Potential zur Expression der zweiten Mta-se Aktivität verloren, d.h. ihre DNAs waren auch sensitiv gegenüber HpaII/MspI (SPR) bzw. Fnu4HI Degradation. Sie entsprachen damit - zumindest phänotypisch - den bereits früher charakterisierten Mutanten SPR26 (Trautner et al., 1980) und ϕ 3T11 (Noyer-Weidner et al., 1981). Nur ein Fünftel der Mutanten - repräsentiert durch SPR19 (Jentsch et al., 1981) und ϕ 3T12 (Noyer-Weidner et al., 1983) - codiert weiterhin für HpaII/MspI bzw. Fnu4HI spezifische Modifikation. Das Restriktionsmuster der WT Phagen und ihrer Mutanten ist in Abb. 2 zusammengefaßt.

Die Häufigkeitsverteilung einfach- und doppeldefizienter Mutanten deutet darauf hin, daß der Verlust beider Mta-se Aktivitäten auf eine pleiotrope Mutation zurückgeht. Einfach- und doppeldefiziente Mutanten sollten dementsprechend zwei grundsätzlich verschiedene Mutantenklassen bilden. Um das zu überprüfen, wurden Rekombinationsversuche zwischen den Phagen-

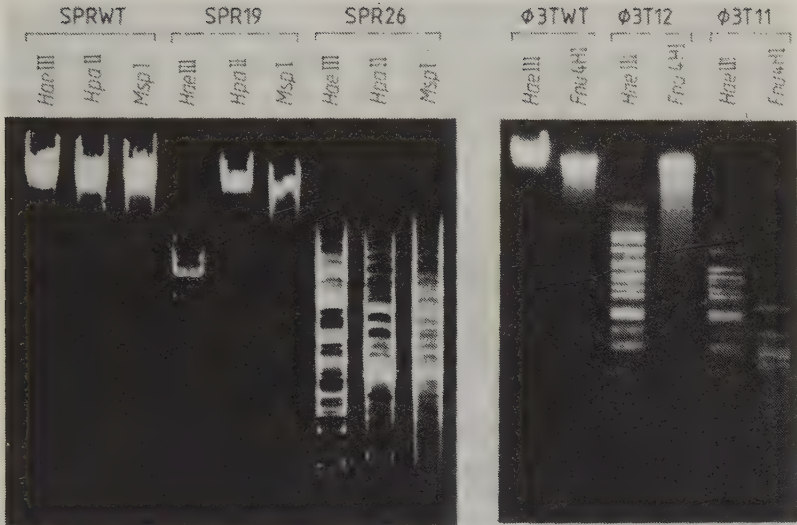


Abb. 2: Resistenzmuster von SPR und $\phi 3T$ WT sowie Mtase defizienter Mutanten: Agarose-Gel-Elektrophorese nach Verdau der DNAs mit den angegebenen Restriktionsenzymen.

Tabelle III: Rekombination zwischen homologen Mtase defizienten Mutanten^a

kompetente Zellen	PFU Nach Rekombination mit der DNA von		
	SPR WT	SPR 19	SPR 26
TB 104 (SPR 19)	$1,8 \times 10^5$	< 10	$1,1 \times 10^5$
TB 102 (SPR 26)	$1,1 \times 10^5$	$5,1 \times 10^4$	< 10

kompetente Zellen	PFU nach Rekombination mit der DNA von		
	ø3T	ø3T 12	ø3T 11
TB 312 (ø3T 12)	$6,5 \times 10^3$	< 10	$5,1 \times 10^2$
TB 311 (ø3T 11)	$1,2 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$	< 10

^a Kompetente Zellen wurden mit $0,5 \mu\text{g}$ der angegebenen DNAs transfiziert.

I.c.'s wurden auf dem BsuR $r^+ m^+$ Stamm TB804 plattiert.

mutanten durchgeführt. Dazu wurden Zellen, die mit Mtase-defizienten Mutanten von SPR und ϕ 3T lysogenisiert waren, mit der DNA von Mutantenphagen und (als Kontrolle) WT Phagen transfiziert (Unrestringierte DNA dieser Phagen ist biologisch inaktiv in der Transfektion nichtlysogener Zellen, da aus unbekannten Gründen nur Teile des Phagengenoms aufgenommen werden). Nach Transfektion wurden die i.c.'s auf dem BsuR r^+m^+ Stamm TB804 ausplattiert. Hierbei zeigte sich, daß plaquebildende Phagen auftraten, obwohl keiner der Parentalphagen auf TB804 plattierbar war. Plaquebildung auf dem selektiven Wirt (Tabelle III) beruhte auf der Entstehung rekombinanter WT Phagen und nicht auf Komplementation, da sich die Resistenz von Phagen, die aus Einzelplaques isoliert worden waren, nach Passage durch einen r^-m^- Wirt als genetisch stabil erwies.

Die hohe Effizienz, mit der BsuR resistente Phagen durch Rekombination homologer Mutanten, d.h. SPR19 und SPR26 einerseits sowie ϕ 3T12 und ϕ 3T11 andererseits, entstehen (Tabelle III) macht deutlich, daß bei beiden Phagen diejenigen Mutationen, die zum Ausfall beider Mtase Aktivitäten geführt hatten, andere Loci betroffen haben als Mutationen, die nur den Verlust einer Mtase Aktivität zur Folge hatten. Doppeldefizienz der Mtase Aktivitäten wird also durch epistatische Mutationen und nicht durch Doppelmutationen bzw. Deletionen verursacht, die den Mutationsort einfach defizienter Mutanten miteinbeziehen. Die durch die hohe Frequenz derartiger epistatischer Mutationen angedeutete enge genetische Kopplung der beiden phagencodierten Mtase Aktivitäten konnte im Falle des Phagen SPR durch Sequenzanalysen (Buhk et al., eingereicht zur Veröffentlichung) bestätigt werden. Beide Mtase Aktivitäten sind an die Expression eines einzigen Strukturgens gebunden. Auf Grund der hier dargestellten Ergebnisse ist mit einer analogen Determination des ϕ 3T Methylierungspotentials zu rechnen.

3.3 Rekombinativer Austausch der Mtase Gene heterologer Phagen

Um die Beziehung der Mtase Gene verschiedener Phagen zu untersuchen, wurden MR Versuche mit heterologen Kombinationen von WT und Mutantenphagen durchgeführt. Diese Versuche sollten auch Aufschluß darüber geben, inwieweit Rekombinationsereignisse an der Verbreitung der Mtase Gene innerhalb dieser Phagengruppe beteiligt gewesen sein könnten.

3.3.1 Quantitative Analyse von Rekombinationsereignissen

Zellen, die mit Mtase defizienten Mutanten von SPR und $\phi 3T$ oder dem nicht modifizierenden Phagen λ lysogenisiert waren, wurden mit undegradierter oder restringierter DNA der verschiedenen WT Phagen transfiziert. Zur Restriktion wurden nur Enzyme benutzt, die das MR Potential der WT DNAs gegenüber homologen Mutanten nicht beeinträchtigen, die also keine Schnittstellen innerhalb der Mtase Gene besitzen. Nach Transfektion wurden die i.c.'s auf dem BsuR r^+m^+ Stamm TB804 plattiert, um auf Mtase profiziente Rekombinanten zu selektieren.

Da Rekombinantenphagen mit hoher Effizienz auftraten (Tabelle IVa und IVb), stellte sich die Frage, ob den Rekombinationsereignissen die Übertragung der gesamten Mtase Gene vom Donor- auf das Rezipientengenom zugrunde lag, oder ob (auch) intragenische Rekombinationsereignisse zwischen heterologen WT und Mutantengenen zur Entstehung der Rekombinanten beigetragen hatten. Deshalb wurden Rekombinationsversuche zwischen heterologen Phagenmutanten, z.B. SPR19 und $\phi 3T$ 11, durchgeführt. Da diese Kreuzungsexperimente nie zum Auftreten BsuR resistenter Rekombinanten führten, läßt sich effiziente intragenische Rekombination, zumindest zwischen den heterologen SPR und $\phi 3T$ Mtase Genen, weitgehend ausschließen. Die in Tabelle IVa und IVb dargestellten Ergebnisse lassen sich daher wie folgt zusammenfassen:

Tabelle IVa: Marker Rescue Versuche

Phagen DNA	Zur DNA Degradation eingesetzte Restriktionsendonuklease	PFU auf TB804 nach Transfektion von 0,5 µg degradiertem Phagen DNA in die lysogenen Stämme:			
		CU 1065 (Z)	TB 102 (SPR 26)	TB 104 (SPR 19)	TB 311 (ø3T 11)
Z	<u>EcoRI</u>	< 10	< 10	< 10	< 10
SPR	<u>EcoRI</u>	< 10	1,2x10 ²	1,4x10 ²	< 10
	<u>BamHI</u>	1,5x10 ⁴	1,1x10 ³	3,2x10 ³	7,4x10 ⁴
SPB	<u>EcoRI</u>	2,1x10 ³	3,2x10 ²	1,2x10 ²	2,5x10 ⁵
ø3T	<u>EcoRI</u>	6,3x10 ²	1,4x10 ²	1,2x10 ²	1,9x10 ⁵
	<u>BglII</u>	8,0x10 ¹	< 10	< 10	1,0x10 ³
ø11	<u>EcoRI</u>	5,8x10 ²	1,7x10 ²	9,0x10 ¹	2,1x10 ⁵
SPP1 ^a	-	8,0x10 ⁴	7,7x10 ²	3,8x10 ²	2,7x10 ³

^a Transfektion mit 0,5 µg undegradierter SPP1 DNA diente dem Vergleich des Kompetenzgrades der verschiedenen Rezipientenstämmen.

Tabelle IVb: Marker Rescue Versuche

Phagen DNA	Zur DNA Degradation eingesetzte Restrik- tionsendonuklease	PFU auf TB804 nach Trans- fektion von 0,5 µg DNA in kompetente Zellen des Stammes TB312 (ø3T 12)
Z	- ^a	< 10
SPR	-	1,5 x 10 ³
	<u>BamHI</u>	1,1 x 10 ²
	<u>EcoRI</u>	< 10
SPB	-	9,9 x 10 ²
	<u>BamHI</u>	2,9 x 10 ³
	<u>EcoRI</u>	< 10
ø3T	-	8,6 x 10 ²
	<u>BamHI</u>	3,5 x 10 ³
	<u>EcoRI</u>	< 10
	<u>BglII</u>	< 10
p11	-	9,8 x 10 ²
	<u>BamHI</u>	6,0 x 10 ³
	<u>EcoRI</u>	< 10
SPP1 ^b	-	1,5 x 10 ²

^a - : Donor DNA wurde undegradiert transfiziert

^b 0,5 µg SPP1 DNA wurden zur Bestimmung des Kompetenzgrades von TB312 transfiziert.

- (1) Mtase defiziente Mutanten von SPR und ϕ 3T können durch Rekombination mit der DNA aller WT Phagen (ausgenommen der des nicht modifizierenden Phagen Z) BsuR-Resistenz erlangen. Die Mtase Gene können also als vollständige Einheiten innerhalb der Gruppe der modifizierenden Phagen SPR, SPB, ϕ 3T und rho 11 übertragen werden. Obwohl Z DNA keine Aktivität als Donor von Mtase Aktivität besitzt, führt Transfektion Z-lysogener Zellen mit der DNA heterologer WT Phagen ebenfalls zur Entstehung Mtase profizienter Phagen. Die Mtase Gene heterologer Phagen können also auch in das Z Genom einrekombiniert werden.

- (2) Auch wenn die zur Degradation der Donor DNAs eingesetzten Enzyme die Mtase Gene nicht inaktivieren, hängt die Effizienz dieses Austausches vom jeweiligen, zur Restriktion benutzten Enzym ab. Diese Abhängigkeit kann in der unterschiedlichen Größe der Fragmente, die das Mtase Gen tragen, sowie in der Position der Mtase Gene innerhalb dieser Fragmente begründet liegen. Interessanterweise sind die Donor DNAs im MR mit ϕ 3T 12 lysogenen Zellen (Tabelle IVb) nur dann aktiv, wenn sie unrestringiert angeboten werden oder mit Enzymen degradiert werden, die sehr große Mtase codierende DNA Fragmente erzeugen (z.B. BamHI, siehe Abb. 8). Die Ursachen hierfür sind unbekannt. Neuere Klonierungsergebnisse, die in diese Arbeit nicht mehr eingegangen sind, zeigen jedenfalls, daß das WT Allel der Mutation 12 auf den gleichen DNA Fragmenten lokalisiert ist wie das WT Allel der Mutation 11.

3.3.2 Qualitative Charakterisierung der Rekombinantenphagen

Die Selektion der Rekombinantenphagen auf Expression der BsuR spezifischen Mtase Aktivität hatte die Frage offengelassen, ob auch das Potential zur Expression der zweiten, nichtselektierten Mtase Aktivität vom Donor auf das Rezipientengenom übertragen worden war. Darüber hinaus war unklar geblieben, ob die Aufnahme des Donor Mtase Gens auf Substitution des Rezipienten Gens oder auf unspezifischer Addition von Donor DNA zum Rezipientengenom beruht. Zur Klärung dieser Fragen wurde daher zunächst das Methylierungspotential der Rekombinantenphagen erfaßt.

Dazu wurde die DNA von Rekombinantenphagen präpariert und in vitro mit den relevanten Restriktionsenzymen degradiert. Da die Lysate vieler Rekombinantenphagen nur sehr niedrige Titer ergaben (ca. 10^5 - 10^7 pfu/ml im Vergleich zu 10^9 - 10^{10} pfu/ml der WT Phagen), konnte das Methylierungspotential von Rekombinanten des Typs $\phi 3T$ WT/SPR19 und $\phi 3T$ WT/Z nicht charakterisiert werden.

Abb. 3 gibt das Methylierungspotential der analysierten Rekombinantentypen wieder. Es zeigt sich, daß alle Rekombinanten das gesamte Methylierungspotential, also auch die zweite, nichtselektierte Mtase Aktivität des Donorphagen exprimieren, ein erneuter Hinweis auf die enge genetische Assoziation beider Aktivitäten. Von besonderem Interesse ist das Methylierungspotential von SPR WT/ $\phi 3T$ 12-Rekombinanten. Auch diese Rekombinanten exprimieren alle SPR codierten Mtase Aktivitäten, haben aber das Fnu4HI spezifische Methylierungspotential des Rezipientenphagen verloren. Dies deutet darauf hin, daß die beobachteten Rekombinationsereignisse tatsächlich Gensubstitution und nicht bloße Addition von Donor DNA in das Rezipientengenom reflektieren.

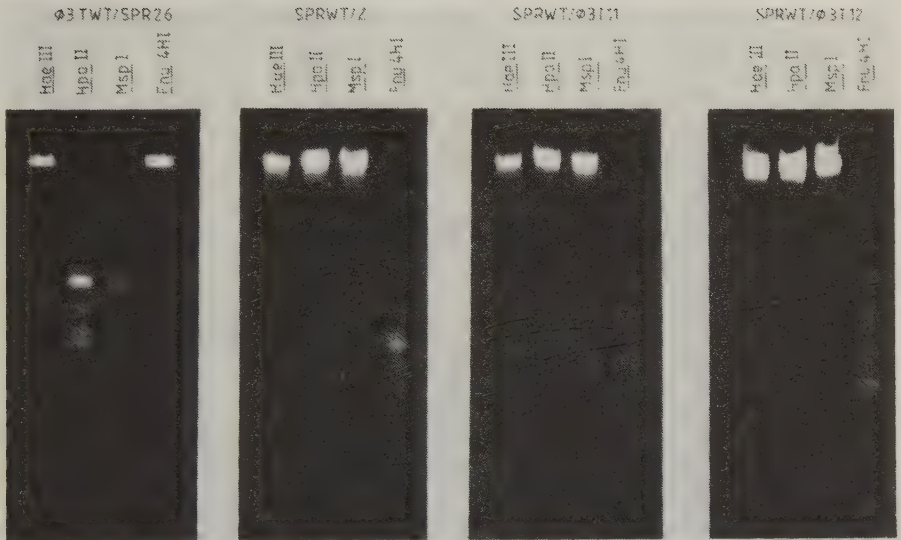


Abb. 3: Methylierungspotential von Rekombinantenphagen.
Die erste Bezeichnung jedes Paares gibt die Donor DNA, die zweite den Prophagen der Rezipientenzelle an. Die Rekombinanten wurden auf folgende Weise erhalten:
 ϕ 3T/SPR26: Transfektion von TB102 (SPR26) mit EcoR-restringierter ϕ 3T WT DNA.
SPR/Z: Transfektion von CU1065 (Z) mit BamHI-restringierter SPR WT DNA.
SPR/ ϕ 3T 11: Transfektion von TB311 mit BamHI-restringierter SPR WT DNA.
SPR/ ϕ 3T 12: Transfektion von TB312 (ϕ 3T 12) mit unde-gradierter SPR WT DNA.
Die Rekombinanten DNAs wurden mit den angegebenen Enzymen restringiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt.

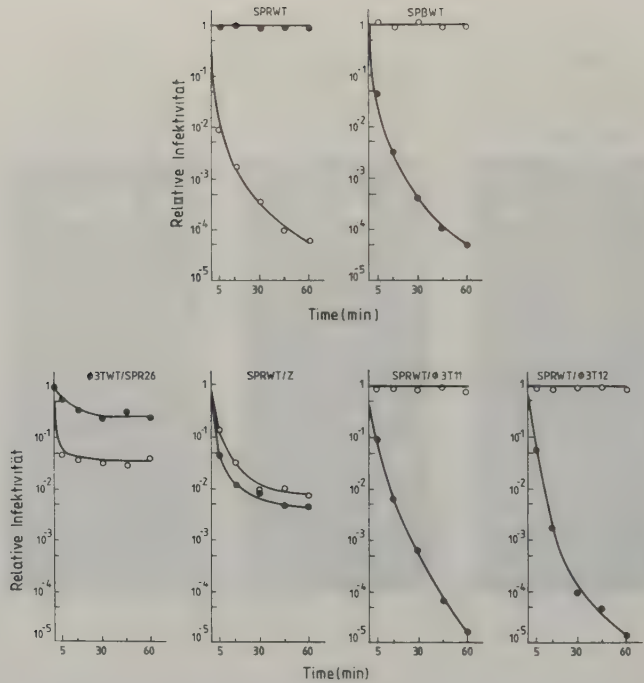


Abb. 4: Serologische Inaktivierungskinetiken von WT und Rekombinantenphagen: o Anti-SPR Serum, ● Anti-SPβ Serum.
Die beiden Kurven im oberen Teil der Abbildung geben Kontrollversuche wieder, in denen die Aktivität der Antiseren gegenüber SPR WT und SPβ WT Lysaten bestimmt wurde. Die Rekombinantenphagen weisen entweder einen gemischten Serotyp (ø3T WT/SPR 26; SPR WT/Z) oder den Serotyp des parentalen Rezipientenphagen (SPR WT/ø3T 11; SPR WT/ø3T 12) auf.

Tabelle V: Methylierungspotential, Homöimmunität und serologische Eigenschaften von Rekombinantenviren

		Eigenschaften	
Rekombinantenvirus ^a		Sensitivität gegen	
		Methylierungspotential Homöimmunitätsgruppe ^b	
		Anti-SPR Serum	Anti-SPB-Serum
ø3T WT/SPR26	<u>HaeIII</u> , <u>Eru4HI</u>	+	+
SPR WT/Z	<u>HaeIII</u> , <u>HpaII</u> , <u>MspI</u>	+	+
SPR WT/ø3T 11	<u>HaeIII</u> , <u>HpaII</u> , <u>MspI</u>	-	+
SPR WT/ø3T 12	<u>HaeIII</u> , <u>HpaII</u> , <u>MspI</u>	-	+

^aDie erste Bezeichnung jedes Paares gibt den Genotyp der Donor DNA, die zweite den Genotyp der Rezipienten DNA an.

^bsiehe Tabelle I.

Wie Tabelle I zeigt, lassen sich die Phagen Z, SPR, SPB, ϕ 3T und rho 11 in Bezug auf Homoimmunität und serologische Eigenschaften in jeweils zwei Gruppen einteilen. Um die Immunität der Rekombinantenviren zu ermitteln, wurden Aliquots ihrer Lysate parallel auf SPB- bzw. ϕ 3T lysogene Zellen aufgetragen. Es zeigte sich, daß sie ausnahmslos der Homoimmunitätsgruppe des Rezipientenviren angehören. Demgegenüber ist eine serologisch eindeutige Zuordnung der Rekombinantenviren nicht immer möglich. Sie besitzen entweder den Serotyp des parentalen Rezipientenviren oder einen neuen Serotyp, der sich durch Sensitivität sowohl gegen anti-SPR als auch gegen anti-SPB Serum auszeichnet (Abb. 4). Methylierungspotential, Immunität und serologische Eigenschaften der analysierten Rekombinantenviren sind in Tabelle V zusammengefaßt.

Offensichtlich sind im Verlauf der beobachteten Rekombinationsereignisse in einigen Fällen neben den Mtase Genen auch Determinanten, die den Serotyp bestimmen, vom Donor- auf das Rezipientengenom übertragen worden. Die Aufnahme von Genen heterologer Phagen, die für Hüllenproteine codieren, bietet auch eine Erklärung für den niedrigen Titer vieler Rekombinantenvirenlysate: Möglicherweise sind bei diesen Phagen die Assembly-Prozesse der Hüllenproteine oder die Interaktion zwischen Phagenhülle und bakteriellem Phagenrezeptor gestört.

3.4 Strukturelle Homologie Mtase codierender DNA Fragmente.

MR Versuche hatten die Austauschbarkeit der Mtase Gene heterologer Phagen erwiesen, es war jedoch unklar geblieben, ob zwischen den Genen selbst strukturelle Verwandtschaft besteht. Um das zu untersuchen, wurden Hybridisierungsexperimente mit klonierten Mtase codierenden DNA Fragmenten von SPR (Behrens et al., 1983) und ϕ 3T (diese Arbeit, siehe Abschnitt 3.6) durchgeführt. In diese Untersuchungen wurden auch chromosomale DNAs von B. subtilis Stämmen, die für unterschiedliche R/M Sy-

steme codieren, miteinbezogen, um eine eventuelle Verwandtschaft zwischen den phagencodierten und chromosomal determinierten Mtase Genen nachzuweisen.

Das Autoradiogramm in Abb. 5 gibt das Ergebnis der Hybridisierungsversuche wieder, die mit dem klonierten SPR Fragment unter stringenten Bedingungen (Hybridisierung erfordert zumindest ca. 70 %ige Homologie) durchgeführt worden waren (Noyer-Weidner et al., 1983). Wie erwartet hybridisiert die radioaktiv markierte Probe intensiv gegen SPR DNA, deutlich schwächere Hybridisierung kann jedoch auch mit jeweils einem Fragment der SPB, ϕ 3T und rho 11 DNA sowie mit der DNA des nicht modifizierenden Phagen Z beobachtet werden. MR Versuche mit den isolierten, hybridisierenden Fragmenten von SPB, ϕ 3T und rho 11 zeigten, daß diese Fragmente tatsächlich das Mtase Gen des jeweiligen Phagen tragen (Noyer-Weidner et al., 1983). Homologie zur chromosomalen DNA des nichlysogenen Stammes TB804, der das bakterielle Gen für die BsuR Mtase trägt, konnte nicht festgestellt werden. Hybridisierung gegen chromosomale DNA erfolgte nur dann, wenn der entsprechende Stamm (TB106) SPR lysogen war.

Die Hybridisierungsversuche mit dem klonierten Mtase codierenden Fragment der ϕ 3T DNA wurden auf die chromosomale DNA des Stammes TB300 ($r^{-}m^{-}$, ϕ 3T lysogen) sowie auf die DNAs der Stämme ISB8, ISC46, ISE15 und ISF18 ausgedehnt, die für weitere B. subtilis R/M-Systeme codieren (Shibata et al., 1979; Ikawa et al., 1980; Jentsch, 1983). Von besonderem Interesse waren dabei das BsuC- und BsuF-System, die möglicherweise allelisch zum BsuR-System sind (Ikawa et al., 1980; Ikawa et al., 1981). Während die Erkennungssequenz des BsuC-Systems noch unbekannt ist, konnte mit der Aufklärung der Sequenzspezifität des BsuF Systems (CCGG) auch der zweiten SPR codierten Mtase Aktivität, die beide Cytosinreste dieser Sequenz methyliert, eine biologische Funktion zugewiesen werden (Jentsch, 1983).

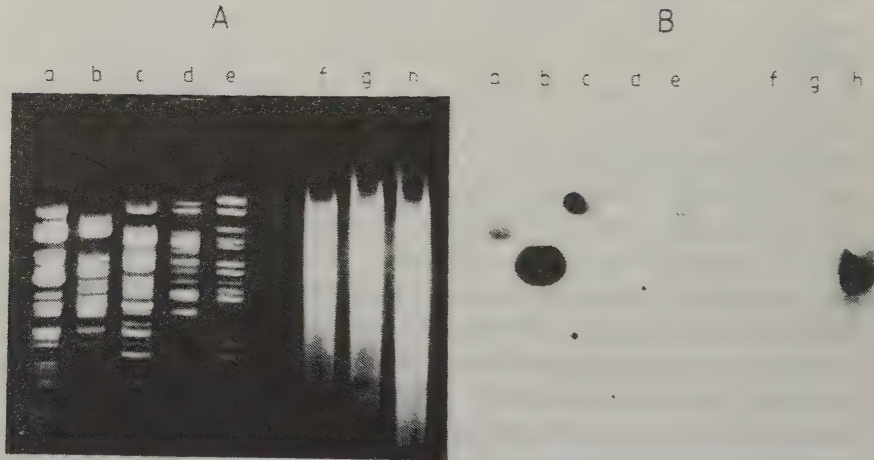


Abb. 5: Hybridisierung des ^{32}P -markierten SPR Mtase codierenden Fragments gegen:
a - e: EcoRI restringierte DNAs der Phagen Z, SPR, SP8, $\phi 3\text{T}$ und rho 11;
f - h: EcoRI restringierte chromosomale DNA der Stämme SB1207, TB804 und TB106.
(A) Gelelektrophorese; (B) Autoradiogramm.

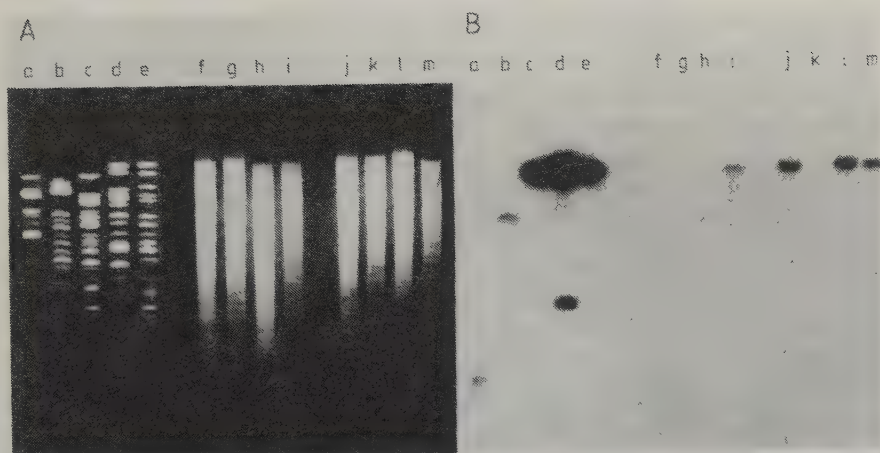


Abb. 6: Hybridisierung des ^{32}P -markierten ø3T Mtase codierenden Fragments gegen:
a - e: *EcoRI* restringierte DNAs der Phagen Z, SPR, ø3T und rho 11.
f - m: *EcoRI* restringierte chromosomale DNAs der Stämme SB1207, TB804, TB106, TB300, ISB8, ISC46, ISE15 und ISF18.
(A) Gelelektrophorese; (B) Autoradiogramm.

Wie das Autoradiogramm (Abb. 6) zeigt, hybridisiert die klonierte ϕ 3T DNA gegen dieselben EcoRI-Fragmente der modifizierenden Phagen SPR, SPB, ϕ 3T und rho 11, gegen die auch das klonierte SPR Fragment hybridisierte, wenn auch mit reziproker Intensität: Starke Hybridisierung erfolgt hier gegen die Fragmente der SPB, ϕ 3T und rho 11 DNAs, deutlich schwächere Hybridisierung gegen das Fragment der SPR DNA.

Während das klonierte SPR-Fragment weitgehend aus dem SPR Mta-se Gen und zugehörigen regulatorischen Sequenzen besteht (Buhk et al., zur Veröffentlichung eingereicht), trägt das klonierte ϕ 3T-Fragment größere Anteile flankierenden Materials (Abschnitt 3.6). Da in diesem flankierenden Bereich eine EcoRI-Schnittstelle lokalisiert ist, erklärt dies zum einen die Hybridisierung gegen ein zusätzliches EcoRI-Fragment der ϕ 3T DNA, das keine Homologie zum Mta-se codierenden Fragment der SPR DNA aufweist. Zum anderen dürfte darauf auch die Hybridisierung gegen zwei EcoRI-Fragmente der Z DNA beruhen, die ebenfalls nicht mit dem klonierten SPR-Fragment hybridisieren. Intensive Autoradiographie läßt aber auch Hybridisierung mit demjenigen EcoRI Fragment der Z DNA erkennen, das durch Homologie zum klonierten SPR-Fragment gekennzeichnet ist (nicht gezeigt).

Wie die Hybridisierungsversuche mit der klonierten SPR DNA, läßt auch die Hybridisierung mit dem klonierten ϕ 3T Fragment unter den gegebenen Bedingungen keine Homologie zu den Mta-se Genen der bakteriellen R/M-Systeme erkennen. Homologie zu chromosomalen DNAs läßt sich nur dann nachweisen, wenn die entsprechenden Stämme lysogen für SPR (TB106), ϕ 3T (TB300) oder SPB (ISB8, ISE15, ISF18) sind, wobei die EcoRI restringierten DNAs der lysogenen Stämme in derselben Position hybridisieren wie die freien Phagen DNAs.

Da das in den hier beschriebenen Versuchen eingesetzte SPR DNA

Fragment neben dem Mtase Gen nur wenig flankierendes Material enthält, kann die Kreuzhybridisierung heterologer Mtase codierender Fragmente nur durch strukturelle Verwandtschaft der Mtase Gene selbst oder durch Homologie in unmittelbar flankierenden Bereichen erklärt werden. Die in Abschnitt 3.9 dargestellten Versuche gehen dieser Fragestellung nach.

3.5 Die Position der Mtase Gene im Genom der Phagen SPB, ø3T und rho 11.

Das Mtase codierende SPR DNA Fragment hatte, wie aus MR Versuchen hervorging, selektiv gegen die Mtase codierenden Fragmente heterologer Phagen hybridisiert. Die Selektivität dieser Hybridisierung konnte zur Lokalisierung der Mtase Gene innerhalb der Phagengenome genutzt werden. Dazu wurden die DNAs der Phagen SPB, ø3T und rho 11 mit Enzymen verdaut, die auch zur Etablierung der Restriktionskarten dieser Phagen (Cregg und Ito, 1979; Mizukami et al., 1980; Fink und Zahler, 1982) benutzt worden waren. Nach Gelelektrophorese wurden die DNA Fragmente auf Nitrozellulosefilter übertragen und gegen eine ³²P-markierte Probe des klonierten SPR Mtase Gens (Behrens et al., 1983) hybridisiert. Hybridisierung erfolgte gegen PstI-Fragment C und BglII-Fragment J der ø3T DNA, gegen BamHI-Fragment A, SalI-Fragment A und BglII-Fragment A der rho 11 DNA und gegen BamHI-Fragment A, PstI-Fragment B und SalI-Fragment A der SPB DNA (Abb. 7). Abb. 8 zeigt Auszüge der Restriktionskarten von SPB, ø3T und rho11, die anhand ihres charakteristischen BamHI-Musters ausgerichtet sind. Die hybridisierenden Fragmente sind durch Schraffur gekennzeichnet. In allen Fällen befinden sich die Mtase Gene an ähnlichen Positionen innerhalb der zentralen Regionen der Phagengenome.

Da keine Restriktionskarten des SPR und Z Genoms existieren, konnte eine entsprechende Lokalisierung des SPR Mtase Gens sowie der homologen Strukturen im Z Genom nicht vorgenommen wer-

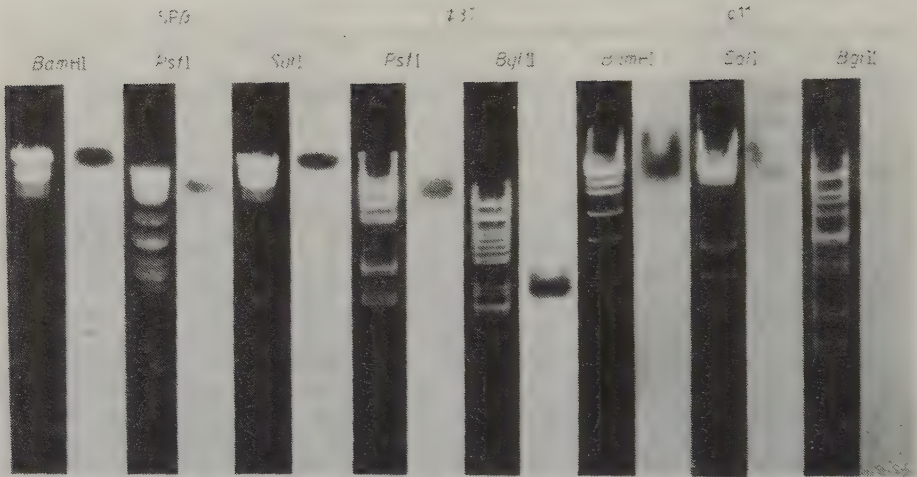


Abb. 7: Lokalisierung der Mtase Gene in den Genomen der Phagen SPβ, ϕ3T und ρ11: Gelelektrophorese restringierter SPβ, ϕ3T und ρ11 DNAs und Autoradiographie nach Hybridisierung gegen ³²P-markierte DNA des klonierten SPR Mtase Gens.

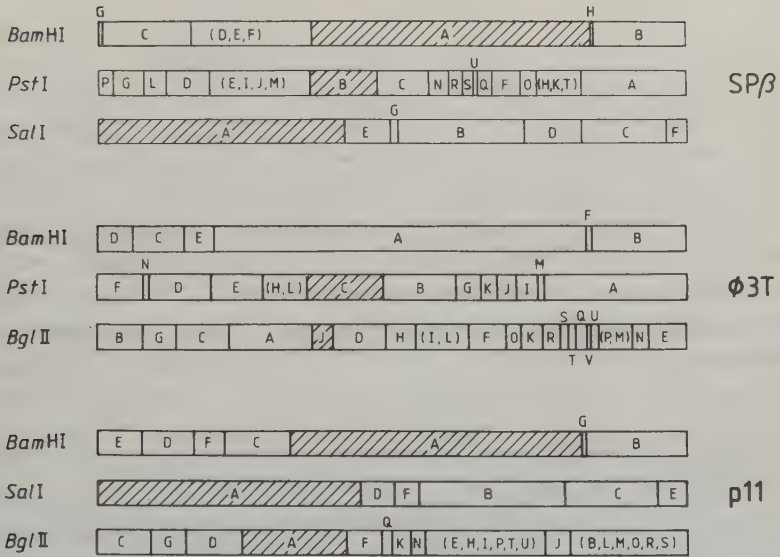


Abb. 8: Position der Mtae Gene innerhalb der publizierten Restriktionskarten von SPβ, ϕ3T und rho 11 (Cregg und Ito, 1979; Mizukami et al., 1980; Fink und Zahler, 1982). Fragmente, die gegen das klonierte SPR Mtae Gen hybridisieren, sind durch Schraffur gekennzeichnet.

den.

3.6 Klonierung des ϕ 3T Mtase Gens in *B. subtilis*.

Durch Klonierungsversuche und Sequenzanalysen (Behrens et al., 1983; Montenegro et al., 1983; Buhk et al., eingereicht zur Veröffentlichung) konnte gezeigt werden, daß die beiden SPR codierten Mtase Aktivitäten auf die Wirkung eines einzigen Genproduktes zurückgehen. Da die beschriebenen genetischen Analysen sowie vorläufige Reinigungsdaten (Günthert, persönliche Mitteilung) eine ähnliche Assoziation der beiden ϕ 3T codierten Mtase Aktivitäten vermuten ließen, werden ebenfalls Klonierungsversuche durchgeführt, um diese Hypothese zu überprüfen.

Für die Klonierung und Expression der Mtase Gene von SPR WT und Mutanten im homologen Wirt war ein Derivat des virulenten *B. subtilis* Phagen SPP1 gewählt worden (Behrens et al., 1983; Montenegro et al., 1983). Um einen Vergleich der Interaktion zwischen Mtase Gen und Vektor zu ermöglichen, schien es sinnvoll, auch das ϕ 3T Mtase Gen in SPP1 zu klonieren. Nach Lokalisierung dieses Gens auf dem BglII Fragment J der ϕ 3T DNA (Größe 2.9 MD), bot sich dafür ein kürzlich konstruierter SPP1 Vektor an, in dessen Genom eine einzige BamHI Erkennungssequenz eingefügt worden war (Heilmann und Reeve, 1982).

3.6.1 Konstruktion eines SPP1/ ϕ 3T Hybridphagen

BamHI restringierte DNA des Vektors SPP1v wurde mit dem isolierten BglII-Fragment J der ϕ 3T DNA ligiert. Das Ligierungsgemisch wurde anschließend erneut mit BamHI restringiert, um in vitro auf Rekombinantmoleküle zu selektieren. Ligierung von BglII- und BamHI-Fragmenten erzeugt an den Fusionspunkten Hybriderkennungssequenzen, die weder für BamHI noch für BglII

Substrat sind. Da BglII Fragment J der ϕ 3T DNA keine BamHI-Sequenz trägt (Abb. 8), werden durch BamHI Restriktion selektiv religierte Vektormoleküle inaktiviert, während Rekombinantmoleküle ungeschnitten und somit biologisch aktiv bleiben. Die präselektierte DNA wurde in Zellen des $r^{-}m^{-}$ Stammes SB1207 transfiziert, um die phänotypische Expression des klonierten Mtase Gens zu ermöglichen. 156 nach Transfektion erhaltene Einzelplaques wurden in Phagenpuffer suspendiert. Aliquots der Suspensionen wurden auf SB1207 sowie dem BsuR $r^{+}m^{+}$ Stamm TB804 aufgetragen. Während alle Suspensionen SB1207 lysierten, führte nur eine Suspension zur Lyse von TB804. Aus dieser Suspension wurde der SPP1/ ϕ 3T-Hybridphage SPP1v31 isoliert.

MR Versuche mit TB311, denen Claverys' Plaque MR Technik zu Grunde lag (Claverys et al., 1981), bestätigten die Präsenz des ϕ 3T Mtase Gens in SPP1v31: Während Plaquesuspensionen des Phagen SPP1v31 hohe MR Aktivität zeigten, waren die Suspensionen aller anderen, nach Transfektion erhaltenen Einzelplaques inaktiv. Offensichtlich hatte nur SPP1v31 das ϕ 3T Mtase Gen vollständig integriert. Alle anderen Phagen hatten das Gen entweder nur bruchstückhaft oder gar nicht aufgenommen, ihre BsuR Sensitivität beruht also nicht auf der Integration des ϕ 3T Mtase Gens in einer nichtexprimierten Orientierung.

Die Tatsache, daß von 156 nach Transfektion erhaltenen Phagen nur einer das ϕ 3T Mtase Gen trägt, widerspricht den Erwartungen, da die DNA vor Transfektion auf Rekombinantmoleküle präselektiert worden war. Mögliche Gründe für dieses Ergebnis werden in Abschnitt 3.6.4, der die Stabilität des Vektors SPP1v betrifft, erörtert.

3.6.2 Methylierungspotential des Hybridphagen SPP1v31

Die Identifizierung des Phagen SPP1v31 war durch Selektion auf

BsuR Resistenz in vivo erfolgt. Eine genaue Analyse zeigt jedoch, daß diese in vivo Resistenz nur partiell gegeben ist (Tab. VI). Sie liegt zwar um mehrere Größenordnungen über der des Vektors SPP1v, erreicht jedoch nicht das Ausmaß der BsuR Resistenz von ϕ 3TWT, dem Donor des klonierten Mtase Gens. Offensichtlich reicht die Expression des klonierten Gens durch den Hybridphagen SPP1v31 nicht aus, um alle BsuR-Sequenzen der SPP1v31 DNA zu modifizieren. Dies wird durch in vitro Restriktion von SPP1v31 DNA bestätigt (Abb. 9): Im Gegensatz zur Vektor DNA zeigt SPP1v31 DNA zwar deutliche Resistenz gegen BsuR (bzw. HaeIII) Degradation, jedoch liegt ein Großteil der Hybrid-DNA-Moleküle nur intermediär methyliert vor. Abb. 9 macht außerdem deutlich, daß SPP1v31 beide Mtase Aktivitäten des Phagen ϕ 3T exprimiert. Neben partieller HaeIII-Resistenz läßt sich auch partielle Fnu4HI-Resistenz der SPP1v31 DNA nachweisen. Das Methylierungspotential der Phagen SPP1v31 bestätigt also genetische Befunde, die eine enge räumliche Assoziation der Determinanten beider Aktivitäten im ϕ 3T Genom ergeben hatten. Darüber hinaus weisen die hier dargestellten Ereignisse deutliche Analogie zur Expression der SPR Mtase Aktivitäten durch einen SPP1/SPR Hybridphagen auf (Montenegro et al., 1983), die ebenfalls nur zu partieller Modifikation der Hybridmoleküle führt.

3.6.3 Restriktionskarte des Hybridphagen SPP1v31

Durch einen Vergleich der Restriktionsmuster von SPP1v- und SPP1v31 DNA konnten zusätzliche EcoRI- und HindIII-Schnittstellen in der DNA des Hybridphagen identifiziert werden. Hybridisierungsversuche mit nick-translatierter ϕ 3T DNA zeigten, daß diese zusätzlichen Schnittstellen auf dem klonierten ϕ 3T Fragment lokalisiert sind (Abb. 10). Auf ähnliche Weise konnte innerhalb des klonierten Segments auch eine SmaI-Schnittstelle identifiziert werden. Durch Korrelation dieser Daten sowie der Restriktionsanalysen subklonierter DNA-Fragmente mit den bekannten Karten von SPP1 WT (Behrens et

Tabelle VI: Vergleich der Restriktionsquotienten
der Phagen SPP1v, SPP1v31 und ϕ 3T WT

Phage	Restriktionsquotient
	<u>Phagentiter auf TB804 (BsuR r⁺m⁺)</u>
	<u>Phagentiter auf SB1207 (BsuR r⁻m⁻)</u>
SPP1v	$7,6 \times 10^{-6}$
SPP1v31	$2,6 \times 10^{-2}$
ϕ 3T WT	$9,3 \times 10^{-1}$

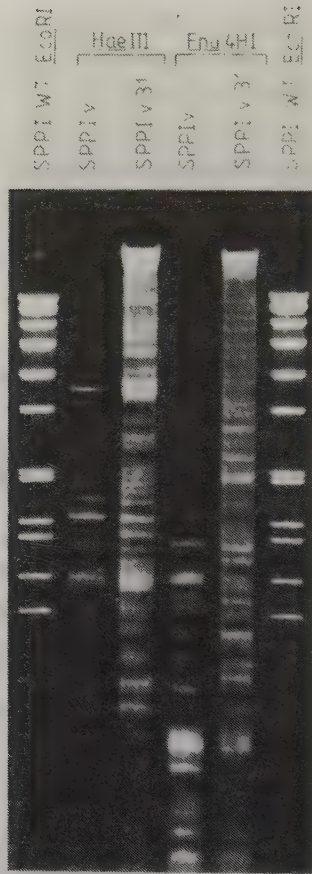


Abb. 9: Methylierungspotential des SPP1/ø3T Hybridphagen SPP1v31: Gelelektrophorese von SPP1v und SPP1v31 DNA nach Degradation mit HaeIII und Fnu4HI. EcoRI restringierte SPP1 WT DNA diente als Größenstandard (Ratcliff et al., 1979).

al., 1979) und SPP1v (Heilmann und Reeve, 1982) konnte eine Restriktionskarte von SPP1v31 etabliert werden, die auszugsweise in Abb. 11 wiedergegeben ist.

Wie diese Karte zeigt, enthält SPP1v31 anstelle der erwarteten 2.9 MD (Größe des zur Klonierung eingesetzten BglII-Fragments) nur ca. 2.0 MD ϕ 3T DNA. Im Verlauf des Klonierungsprozesses muß es also zu einer Deletion gekommen sein, wobei ausschließlich ϕ 3T DNA deletiert wurde, da die BamHI/BglII-Fusionspunkte zwischen Vektor- und ϕ 3T DNA erhalten geblieben sind. Um den Deletionsort innerhalb des klonierten Fragments genauer zu charakterisieren, wurden ϕ 3T/SPP1v31 Heteroduplexmoleküle hergestellt und elektronenmikroskopisch untersucht. Die Vermessung von 20 Heteroduplexmolekülen, von denen eines in Abb. 12 dargestellt ist, führte zu folgendem Ergebnis: Beide Moleküle sind über einen Bereich vom 2.0 MD homolog, was zur Ausbildung eines Doppelstranges führt. Ungefähr im Zentrum des Doppelstrangbereiches (ca. 0,9 bzw. 1,1 MD von den Enden entfernt) findet sich ein einzelsträngiger Loop, dessen Größe (0.8 MD) der des deletierten Materials entspricht. Das in SPP1v31 klonierte ϕ 3T DNA Fragment besteht also aus Regionen, die ursprünglich durch das deletierte Material voneinander getrennt waren.

Um die Position des Mtase Gens innerhalb des klonierten DNA Segments zu lokalisieren, wurden MR Versuche mit den durch Hybridisierung gegen ϕ 3T DNA gekennzeichneten HindIII Fragmenten der SPP1v31 DNA (Abb. 10) durchgeführt. Dazu wurden die entsprechenden HindIII Fragmente zunächst isoliert und durch Ligierung mit phosphatasebehandelter, HindIII-restringierter pBR328 DNA subkloniert. Anschließend wurden die Hybridplasmide in ϕ 3T 11 lysogene Zellen transformiert. BsuR resistente Rekombinanten wurden wiederum durch Plattierung der i.c's auf dem r^+m^+ Stamm TB804 selektiert. Während Hybridplasmide, die das HindIII Fragment 3 der SPP1v31 DNA (Abb. 10) trugen, hohe MR Effizienz zeigten (ca. 10^3 Rekombinanten/0,1 μ g Plasmid

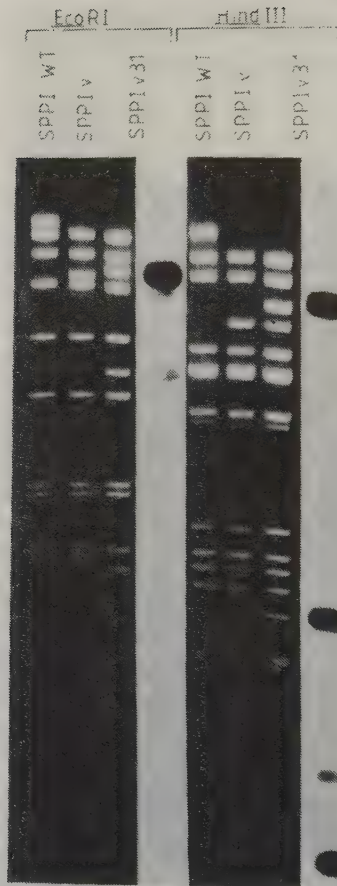


Abb. 10: Identifikation klonierter ϕ 3T DNA in SPP1v31: Gelelektrophorese von SPP1 WT, SPP1v und SPP1v31 DNA nach Degradation mit den angegebenen Enzymen. Die Autoradiogramme zeigen die Hybridisierung 32 P-markierter ϕ 3T DNA gegen die restringierte SPP1v31 DNA.

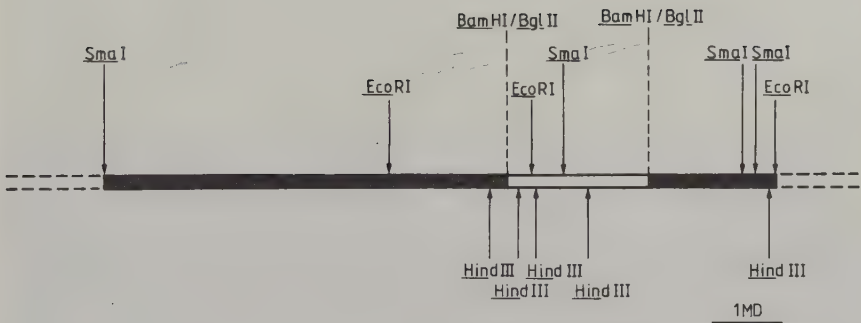


Abb. 11: Auszugsweise Darstellung der Restriktionskarte des ø3T/SPP1 Hybridphagen SPP1v31. Die Vektor DNA ist als schwarzer, die inserierte ø3T DNA als weißer Balken dargestellt.

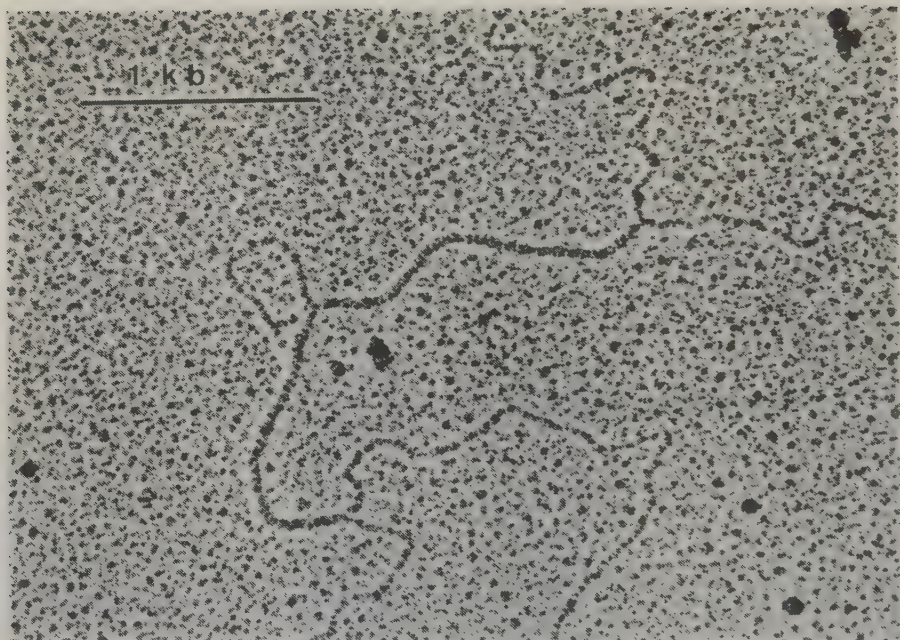


Abb. 12: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer SPP1v31/
ø3T Heteroduplex DNA. Der Einzelstrangloop im
Heteroduplexbereich kennzeichnet die Position und
Länge der bei Klonierung deletierten ø3T DNA.

DNA), waren Rekombinantenplasmide, die die anderen HindIII Fragmente trugen, im MR inaktiv. Auf Grund dieser Ergebnisse kann das WT Allel der Mutation 11 (und, wie weitere Versuche zeigen, auch das ϕ 3T Mtase Gen) auf der rechten Flanke der in SPP1v31 klonierten ϕ 3T DNA lokalisiert werden. Keines der hier dargestellten Rekombinantenplasmide war im MR mit ϕ 3T 12 lysogenen Zellen aktiv. Dies heißt jedoch nicht, daß das WT Allel der Mutation 12 nicht auf dem in SPP1v klonierten Fragment lokalisiert ist, da im MR mit ϕ 3T 12 aus ungeklärten Gründen nur Fragmente aktiv sind, die das Mtase Gen in beiden Richtungen weit überspannen (siehe Abschnitt 3.3.1).

In vitro Restriktion mit HaeIII und Fnu4HI zeigte, daß keines der hier beschriebenen Rekombinantenplasmide ϕ 3T Mtase Aktivitäten exprimierte. Es ist daher anzunehmen, daß Strukturen, die für die Expression des ϕ 3T Mtase Gens erforderlich sind, über die in der rechten Flanke lokalisierte HindIII-Schnittstelle hinweggehen.

3.6.4 Anmerkungen zur Stabilität des Vektors SPP1v.

Nach Transfektion der in vitro präselektierten DNA hatte nur einer von 156 potentiellen Rekombinantenphagen das ϕ 3T Mtase Gen integriert, wobei auch bei diesem Phagen ein Teil des zur Klonierung angebotenen Materials deletiert war. Zwei Erklärungen für diese Befunde bieten sich an:

- (1) Der Phage SPP1v wurde in einer Weise konstruiert, die die BamHI-Sequenz zum Zentrum einer palindromartigen Struktur macht, die sich über 26 Basenpaare erstreckt (Heilmann und Reeve, 1982). Diese Struktur scheint Rekombinationsereignisse, die zum Verlust der BamHI-Sequenz (und möglicherweise auch zum Verlust von integriertem Material) führen, zu begünstigen. So zeigen Transfektions-

versuche mit BamHI-restringierter SPP1v DNA, die ausgehend von einem Einzelplaque präpariert wurde, daß stets ein Teil der Moleküle biologisch aktiv bleibt, also zur Bildung von Phagenplaques führt. Eine Analyse der DNA dieser Phagen ergibt, daß sie im Gegensatz zur SPP1v DNA BamHI resistent ist, ansonsten aber keine wahrnehmbaren Unterschiede im Restriktionsmuster gegenüber SPP1v DNA aufweist (Daten nicht gezeigt). Der Verlust der BamHI Sequenz im Verlauf des Phagenwachstums muß also auf kleine Deletionen zurückgehen, die die unmittelbare Umgebung dieser Sequenz betreffen.

(2) Zur Konstruktion von SPP1v wurde ein Deletionsderivat von SPP1 WT benutzt, dem 2.1 MD der WT DNA fehlen (Heilmann und Reeve, 1982). Offenbar ist die Aufnahmekapazität des Vektors in etwa auf die Kompensation dieser Deletion beschränkt. Fragmente, die größer als 2.0 MD sind, können nur schwer kloniert werden und führen zur Instabilität der Hybridphagen (Reeve, pers. Mitteilung).

Beide Erklärungen zusammengenommen bieten zum einen eine Begründung dafür, daß die überwiegende Zahl der nach Transfektion erhaltenen Phagen, trotz der in vitro erfolgten Präselektion des Ligierungsgemisches, das ϕ 3T Mtase Gen nicht integriert hatte. Zum anderen scheint die bei SPP1v31 beobachtete Deletion mit der Biologie des Vektors zusammenzuhängen, die offenbar nur eine limitierte Größe der Rekombinantengenome zuläßt. Interessanterweise erfolgte auch bei Klonierung des SPR Mtase Gens in ein analoges SPP1 Derivat (Behrens et al., 1983) eine Deletion, die die Größe des zur Klonierung angebotenen Fragments auf ca. 1.3 MD verkürzte.

Auf Grund der beschriebenen Instabilitäten des Vektors wurde von weiteren Versuchen die Mtase Gene von ϕ 3T WT und ϕ 3T Mutanten in SPP1V zu klonieren, abgesehen.

3.7 Klonierung der ϕ 3T, rho 11 und SPB Mtase Gene in E. coli

Für die Klonierung der Phagen Mtase Gene im heterologen Wirt E. coli gibt es mehrere Gründe: Zum einen kann sie Aufschluß darüber geben, ob für die Expression der Mtase Gene in E. coli Signalstrukturen genutzt werden können, die ebenfalls auf den klonierten Fragmenten lokalisiert sind. Dieser Frage kommt insofern Bedeutung zu, als Strukturen, die in B. subtilis als Promotoren wirksam sein können, eine wesentlich höhere Variabilität als entsprechende E. coli Signalsequenzen aufweisen. Darüber hinaus kann die Klonierung der Phagen Mtase Gene im heterologen Wirt in mehrfacher Hinsicht die Reinigung und Charakterisierung der entsprechenden Genprodukte erleichtern. Voraussetzung dafür ist allerdings eine effiziente Synthese der Genprodukte. Die Klonierung des SPR Mtase Gens in einem Plasmidvektor (Kiss und Baldauf, 1983) hatte eine deutlich höhere Expression der SPR Mtase Aktivitäten als die Klonierung des selben SPR DNA Fragments in einem Phagenvektor (Montenegro et al., 1983) ergeben. Deshalb wurde für die Klonierung der SPB, ϕ 3T und rho 11 Mtase Gene ebenfalls ein Plasmidvektor gewählt.

3.7.1 Konstruktion der Rekombinantenplasmide.

Die Konstruktion von Hybridplasmiden, die die Mtase Gene der Phagen tragen, folgt einer Methode, die bereits früher erfolgreich zur Klonierung von Mtase Genen in Plasmiden genutzt worden war (Szomolanyi et al., 1980; Kiss und Baldauf, 1983). Sie geht davon aus, daß die Expression klonierter Mtase Gene den Rekombinantenplasmiden Resistenz gegenüber cognaten Restriktionsenzymen verleihen sollte. Auf Grund dieser Selektionsmöglichkeit entfällt die Notwendigkeit, die Klonierung gezielt mit isolierten Fragmenten, die die Mtase Gene tragen, durchzuführen.

Die Analyse des in SPP1 klonierten ϕ 3T Fragments hatte ergeben, daß HindIII eine Schnittstelle innerhalb des Mtase Gens sowie mehrere Schnittstellen in seinen unmittelbar flankierenden Bereichen besitzt. Auf Grund von Hybridisierungsversuchen (Abschnitt 3.4) und MR Experimenten konnte auf eine prinzipiell ähnliche Struktur der SPB und rho 11 Mtase Gene geschlossen werden.

Um die Struktur der Mtase Gene nicht zu zerstören und gleichzeitig flankierendes Material der Gene möglichst gering zu halten, wurden die gesamten DNAs der Phagen SPB, ϕ 3T und rho 11 daher jeweils partiell mit HindIII verdaut. Die degradierten DNAs wurden mit dem phosphatasebehandelten, HindIII restringierten Vektor pBR328 ligiert und das Ligierungsgemisch anschließend in kompetente Zellen des E. coli Stammes HB101 transformiert. Ein Aliquot des Transformationsansatzes, das ca. 5000 Rekombinantenkclone (Amp^R , Cm^R , Tc^S) enthielt, wurde zur Beimpfung von 100 ml L-Broth (+ 100 $\mu\text{g/ml}$ Cm) eingesetzt und bis zur stationären Phase gezogen. Die gesamte Mischpopulation der Plasmide wurde isoliert, anschließend wurden 2 μg der Plasmid DNA mit einem 20-fachen Überschuß an HaeIII Restriktionsendonuklease degradiert. Obwohl nach Agarose-Gel-Elektrophorese keine intakten Moleküle mehr sichtbar waren, führte erneute Transformation des Stammes HB101 mit der degradierten DNA zum Auftreten mehrerer hundert ampicillin- und chloramphenicolresistenter, jedoch tetrazyklinsensitiver Klone. Die Restriktionsanalyse von Plasmid-Minipräparationen zeigte, daß alle Plasmide dieser Klone HaeIII resistent waren.

3.7.2 Restriktionskarten der Rekombinantenplasmide

Von je 5 unabhängig voneinander erhaltenen Rekombinantenklonen wurde die Plasmid DNA isoliert und mit HindIII restringiert. Es zeigte sich, daß alle Plasmide zumindest 2 HindIII-Fragmente inseriert hatten. Während das kleinere der klonierten

HindIII-Fragmente in allen Rekombinantenplasmiden ein Molekulargewicht von ca. 0.7 MD besitzt, beträgt das Molekulargewicht des größeren Fragments im Falle klonierter SPB- und rho 11 DNA ca. 1,0 MD, im Falle klonierter ϕ 3T DNA ca. 1,2 MD (Abb. 13). Innerhalb der klonierten DNA Segmente befinden sich 3 HpaI-Schnittstellen. Da diese Schnittstellen asymmetrisch lokalisiert sind, konnten sie zur Orientierungsbestimmung der integrierten DNA benutzt werden. Wie aus Abb. 13 hervorgeht, wurden die klonierten SPB, ϕ 3T und rho 11 DNA Segmente jeweils in beiden Relativorientierungen zum Vektor inseriert. In Abb. 14 sind die Restriktionskarten der EcoRI linearisierten Rekombinantenplasmide dargestellt. Die Lokalisierung der zentralen HpaI-Schnittstelle erfolgte auf Grund von Restriktionsanalysen der subklonierten HindIII-Fragmente. Bereits anhand dieser Restriktionskarten läßt sich auf die enge Verwandtschaft der klonierten SPB, ϕ 3T und rho 11-Fragmente und damit indirekt auch auf die Verwandtschaft der Phagen Mtase Gene schließen. Dagegen unterscheiden sich diese Restriktionskarten grundsätzlich von denen SPR Mtase codierender Fragmente (siehe Abb. 17).

3.7.3 Methylierungspotential der Rekombinantenplasmide

Die Rekombinantenplasmide waren auf Grund ihrer BsuR (bzw. HaeIII) Resistenz selektiert worden. Restriktion der Plasmide pBN16, pBN17, pBN18, pBN19, pBJ20 und pBJ21 mit HaeIII und Fnu4HI zeigt jedoch, daß die Rekombinantenplasmide, wie erwartet, beide phagencodierten Mtase Aktivitäten exprimieren (Abb. 15). Während die Expression der ϕ 3T Mtase Aktivitäten durch den Hybridphagen SPP1v31 nur zur partieller Modifikation der Hybrid DNA Moleküle führt (siehe Abschnitt 3.6.2), erweist sich die DNA der ϕ 3T Mtase codierenden Rekombinantenplasmide pBN16 und pBN17 als vollständig resistent gegen HaeIII und Fnu4HI Degradation. Die rho 11 und SPB Mtase codierenden Rekombinantenplasmide exprimieren die phagencodierten Mtase Aktivitäten ebenfalls effizient und unabhängig von der Orientie-

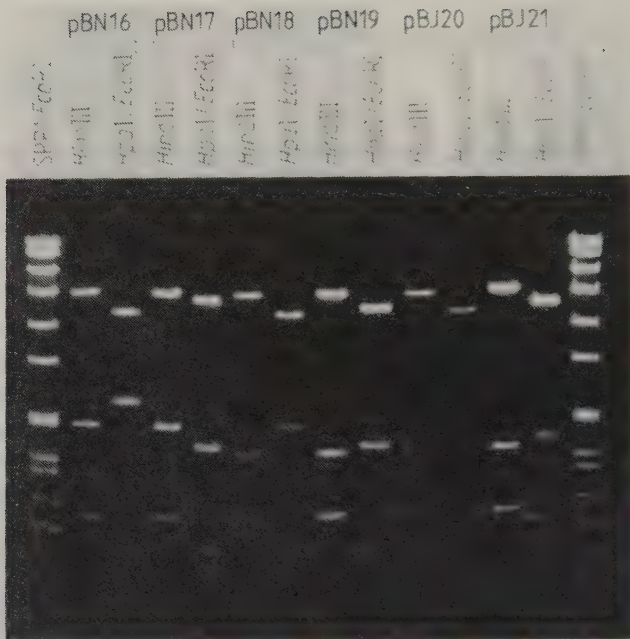


Abb. 13: Restriktionsanalyse ϕ 3T (pBN16, pBN17), rho 11 (pBN18, pBN19) und SP β (pBJ20, pBJ21) M_tase co-dierender Rekombinantenplasmide. EcoRI degradierte SPP1 WT DNA diente als Gr $\ddot{o}$ ssenstandard (Ratcliff et al., 1979).

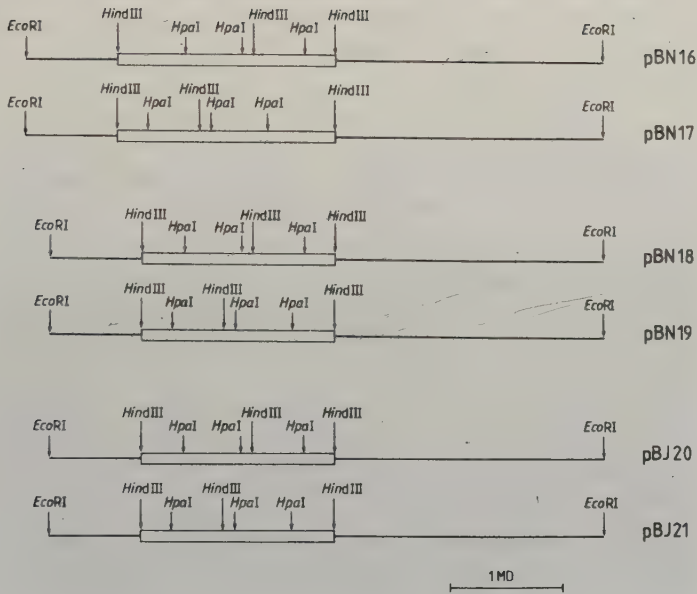


Abb. 14: Restriktionskarten ϕ 3T, rho 11 und SP β Mtase codierender Rekombinantenplasmide. Die Vektor DNA (pBR328) ist als einfache Linie, die klonierte ϕ 3T (pBN16, pBN17), rho 11 (pBN18, pBN19) und SP β (pBJ20, pBJ21) DNA als Doppellinie dargestellt.

rung der integrierten DNA. Da in der Umgebung der HindIII-Schnittstelle von pBR328 keine Promotoren identifiziert wurden, auf die die orientierungsunabhängige Expression zurückgeführt werden kann, ist es wahrscheinlich, daß die Transkription der klonierten Mtase Gene von Promotoren ausgeht, die ebenfalls auf den klonierten Fragmenten lokalisiert sind.

Subklonierung der beiden in pBN16, pBN18 bzw. pBJ20 integrierten HindIII-Fragmente in pBR328 führte in keinem Fall zur Expression der phagencodierten Mtase Aktivitäten. Offensichtlich ist die Expression der Mtase Aktivitäten durch die hier charakterisierten Rekombinantenplasmide an Strukturen gebunden, die die interne HindIII-Schnittstelle der klonierten ϕ 3T, rho 11 und SPB DNA Segmente überspannen.

3.8 Lokalisierung des ϕ 3T Mtase Gens innerhalb der in SPP1v31 und pBN16 klonierten Fragmente.

Durch Restriktionsanalysen Mtase codierender ϕ 3T DNA Fragmente und Korrelation dieser Daten mit der Restriktionskarte des ϕ 3T Genoms (Cregg' and Ito, 1979) konnte eine Restriktionskarte des BglII-Fragments J der ϕ 3T DNA aufgestellt werden. Die Etablierung dieser Karte erlaubt die Lokalisierung der Deletion, die zu einer Verkürzung dieses Fragments im Verlauf seiner Klonierung in SPP1v geführt hatte (Abschnitt 3.6.3) und ermöglicht infolgedessen eine ungefähre Positionierung des ϕ 3T Mtase Gens sowohl innerhalb des BglII Fragments J und seines klonierten Derivats als auch innerhalb der in pBN16 klonierten ϕ 3T DNA Segmente.

Der Übersicht halber sind die Restriktionskarten des BglII-Fragments J und der in SPP1v31 und pBN16 klonierten DNA Segmente in Abb. 16 zusammengestellt. Die Orientierung der Karten

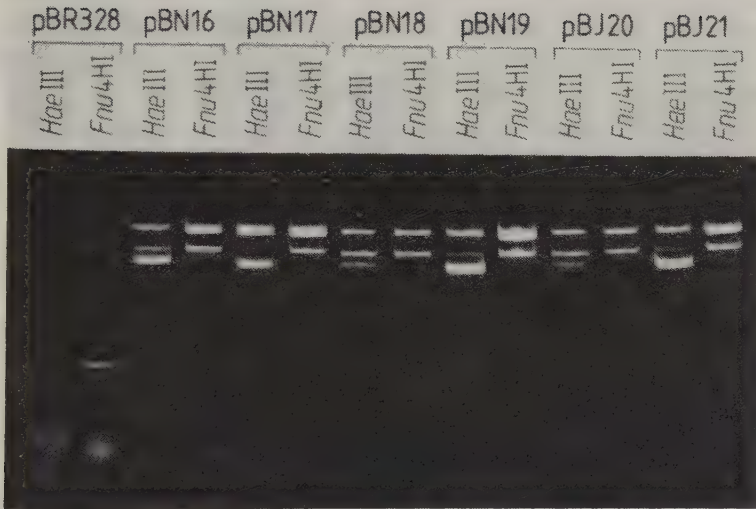


Abb. 15: Methylierungspotential ϕ 3T, rho 11 und SPB Mtase codierender Rekombinantenplasmide. Gelelektrophorese von pBN16, pBN17, pBN18, pBN19, pBJ20 und pBJ21 DNA nach Inkubation mit HaeIII und Fnu4HI. HaeIII und Fnu4HI degradierte DNA des Vektors diente als Kontrolle.

erfolgte auf Grund der Identität des in pBN16 klonierten 1.2 MD HindIII-Fragments und des 1.0 MD großen Teilfragments, das von der rechtsgelegenen HindIII-Schnittstelle zum rechten Ende des BglII-Fragments J reicht. Diese Identität wird zum einen durch das MR Potential dieser Fragmente bestätigt: Sie alle tragen das WT Allel der ϕ 3T Mutation 11 (Daten nicht gezeigt). Zum anderen enthält das in pBN16 klonierte 1.2 MD HindIII-Fragment eine BglII-Schnittstelle, die dieses Fragment in Teilstücke von ca. 1.0 und 0.2 MD zerlegt (Abb. 16).

Die Lokalisierung der Deletion (Abb. 16) kann auf Grund der elektronenmikroskopischen ϕ 3T/SPP1v31 Heteroduplexanalysen vorgenommen werden (siehe Abschnitt 3.6.3), die gezeigt hatten, daß das in SPP1v31 klonierte BglII J Derivat Flanken von ca. 0.9 und 1.1 MD Größe vereinigt. Da die rechtsgelegene HindIII-Schnittstelle von BglII J, deren Abstand zum rechten Ende des Fragments ca. 1.0 MD beträgt, nicht von der Deletion betroffen wurde, muß die 1.1 MD große Flanke dem rechten, die 0.9 MD große Flanke dem linken Teil des Fragments entsprechen.

Subklonierung von SPP1v31 bzw. pBN16 DNA Fragmenten, die das WT Allel der ϕ 3T Mutation 11 tragen, hatte gezeigt, daß die Präsenz dieser Fragmente alleine nicht zur Expression der ϕ 3T Mtase Aktivitäten durch die Rekombinantenplasmide ausreicht. Offenbar werden dazu Strukturen benötigt, die auf dem angrenzenden Fragment liegen. Die Lokalisierung der Deletion schränkt jedoch den zur Expression erforderlichen Anteil der benachbarten Fragmente auf einen Bereich von ca. 0,1 MD ein. Berücksichtigt man das MW der ϕ 3T codierten Mtase (ca. 47500, siehe Abschnitt 3.11) so läßt sich erwarten, daß die Mtase codogene Sequenz - ähnlich wie im Falle des SPR Mtase Gens (Buhk et al., zur Veröffentlichung eingereicht) - innerhalb eines Bereichs von ca. 1 MD liegt. Dieser Bereich, der die ungefähre Position des ϕ 3T Mtase Gens wiedergibt, ist in Abb. 16 durch Schraffur gekennzeichnet.

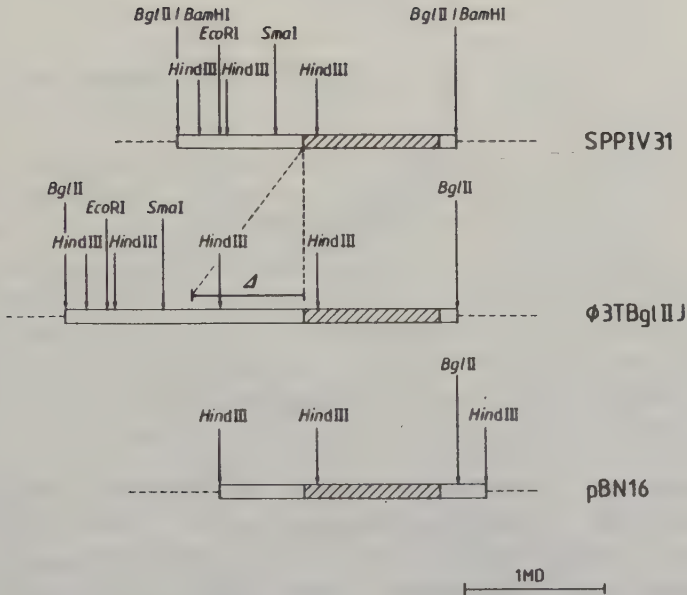


Abb. 16: Ungefähre Positionierung des $\phi 3T$ Mtase Gens innerhalb Mtase codierender Fragmente. Der mit Δ bezeichnete Bereich des $\phi 3T$ *Bgl*II Fragments J wurde bei Klonierung in SPP1v deletiert. Der Bereich, in dem das $\phi 3T$ Mtase Gen lokalisiert werden kann, ist durch Schraffur gekennzeichnet.

Auf Grund der Ähnlichkeit der in pBN16, pBN18 und pBJ20 klonierten HindIII-Fragmente, und auf Grund der Tatsache, daß die 1.0 MD HindIII-Fragmente von pBN18 und pBJ20 ebenfalls aktiv im Marker Rescue mit ϕ 3T11-lysogenen Zellen sind, kann mit einer analogen Position der rho 11 bzw. SPB Mtase Gene in den Plasmiden pBN18 und pBJ20 gerechnet werden.

3.9 Hybridisierung Mtase codierender Rekombinantenplasmide

Die Kreuzhybridisierung Mtase codierender SPR und ϕ 3T DNA Fragmente (Abschnitt 3.4) konnte durch Homologie der Mtase Gene selbst oder ihrer unmittelbar flankierenden Bereiche verursacht sein. Nach der Sequenzierung des SPR Mtase codierenden DNA⁻ Fragments (Buhk et al., eingereicht zur Veröffentlichung) und der ungefähren Positionierung des ϕ 3T Gens innerhalb klonierter DNA Fragmente waren die Voraussetzungen gegeben, um zwischen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden.

Dazu wurden die Plasmide pSPR5 (Abb. 17) und pBN16, pBN18 sowie pBJ20 (Abb. 14) mit HindIII restringiert. Nach Gelelektrophorese wurden die Fragmente auf Nitrocellulosefilter transferiert und anschließend gegen ³²P-markierte pSPR5 oder pBN16 DNA hybridisiert. Wie das Autoradiogramm (Abb. 18B) zeigt, hybridisiert pBN16 nur gegen die HindIII Fragmente 1 und 2 der pSPR5 DNA. Während Fragment 1 nahezu ausschließlich aus Vektor DNA besteht, erhält Fragment 2 den Hauptteil flankierender SPR DNA, die dem SPR Mtase Gen folgt, sowie 125 Basenpaare vom Ende des SPR Mtase Gens (Abb. 17). Gegen alle anderen HindIII-Fragmente der pSPR5 DNA, die nahezu das gesamte Strukturgen der SPR Mtase sowie flankierende Bereiche enthalten, die dem Mtase Gen vorangehen, erfolgt keine Hybridisierung. Das zeigt, daß offensichtlich keine unter diesen Hybridisierungsbedingungen nachweisbare strukturelle Verwandtschaft zwischen den SPR und ϕ 3T Mtase Genen besteht. Das reziproke Hybridisierungsexperiment bestätigt dies: pSPR5 DNA

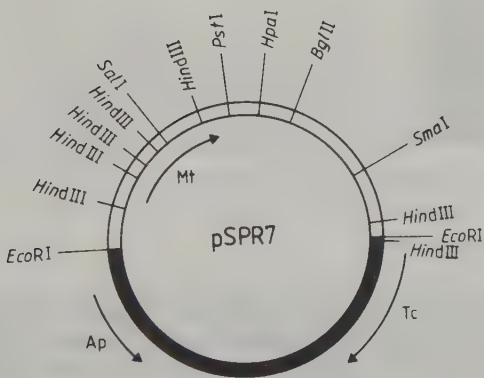
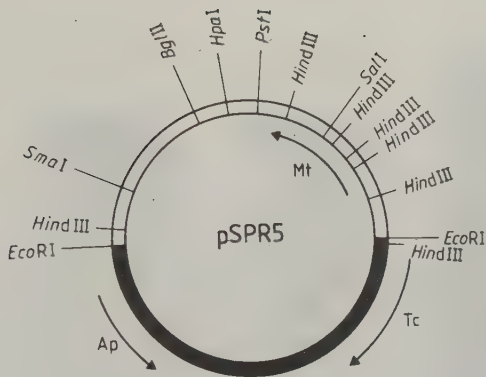


Abb. 17: Restriktionskarten der SPR Mtase codierenden Rekombinantenplasmide pSPR5 und pSPR7.



Abb. 18: Untersuchungen zur Sequenzhomologie der Mtase Gene:
(A) Gelelektrophorese von pSPR5, pBN16, pBN18 und pBJ20 DNA (a - d) nach Degradation mit *Hind*III. *Eco*RI re-stringierte SPP1 WT DNA diente als Molekulargewichtsstandard (MWS) (Ratcliff et al., 1979).
(B) Autoradiogramm nach Hybridisierung gegen ^{32}P -markierte pBN16 DNA.
(C) Autoradiogramm nach Hybridisierung gegen ^{32}P -markierte pSPR5 DNA.

hybridisiert gegen das 0.7 MD HindIII Fragment der Plasmide pBN16, pBN18 und pBJ20, das zum großen Teil aus flankierendem Material der Phagen Mtase Gene besteht. Homologie zu den größeren HindIII Fragmenten, die den Hauptteil der Phagen Mtase Gene tragen (Abschnitt 3.8), besteht nicht (Abb. 18C). Offensichtlich beruht die in Abschnitt 3.4 beobachtete Kreuzhybridisierung Mtase codierender SPR und ϕ 3T Fragmente auf homologen Strukturen, die einer Flanke aller Phagen Mtase Gene gemeinsam sind. Allerdings kann auf Grund der vorliegenden Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, daß das 125 Basenpaare lange Endstück des SPR Mtase Gens an diesen Hybridisierungen mitbeteiligt ist.

Im Unterschied zu pSPR5 hybridisiert pBN16 intensiv gegen beide HindIII Fragmente der in pBN18 und pBJ20 klonierten rho 11 bzw. SPB DNA (Abb. 18B). Setzt man dieses Ergebnis in Bezug zu den Restriktionskarten der klonierten DNA-Fragmente (Abschnitt 3.7.2) und zu der Tatsache, daß größere der in pBN16, pBN18 und pBJ20 klonierten HindIII-Fragmente aktiv im MR mit ϕ 3T 11 lysogenen Zellen ist, so ergibt sich daraus eine deutliche Verwandtschaft der Mtase Gene von ϕ 3T, rho 11 und SPB.

3.10 Klonierbarkeit Mtase codierender DNA Fragmente in E. coli Plasmidvektoren

3.10.1 Stammspezifische Toleranz Mtase exprimierender Rekobminantenplasmide in E. coli

Die Klonierung der Mtase Gene der Phagen SPR, SPB, ϕ 3T, und rho 11, in E. coli Plasmidvektoren war nur im Stamm HB101 erfolgreich verlaufen. Alle Versuche, die Mtase Gene im Stamm C600 zu klonieren - entweder durch Selektion über die Genex-

pression oder durch gezielte Insertion von Mtase codierenden Fragmenten - waren fehlgeschlagen. Da im Verlauf gezielter Klonierungsversuche Vergleichsfragmente, die aus anderen Bereichen der Phagengenome stammten, effizient kloniert werden konnten, lag es nahe, biologische Ursachen für dieses Fehlschlagen anzunehmen. Die Etablierung Mtase exprimierender Rekombinantenplasmide im Stamm HB101 bot die Möglichkeit, diese Ursachen genauer zu untersuchen.

Dazu wurde die Transformationsaktivität verschiedener Mtase exprimierender Rekombinantenplasmide mit kompetenten Zellen von HB101 und C600 ermittelt. In diese Versuche wurde das Plasmid pSU15 (Kiss und Baldauf, 1983) miteinbezogen, das das Mtase Gen des bakteriellen BsuR Systems trägt. Wie Tabelle VII zeigt, transformieren alle Plasmide den Stamm HB101 mit hoher Effizienz. Dagegen werden keine Transformanten des Stammes C600 gefunden. Da die Mtase Gene von SPR einerseits und SPB, ϕ 3T und rho 11 andererseits keine enge strukturelle Homologie aufweisen und ebensowenig mit dem chromosomalen Mtase Gen des BsuR R/M-Systems verwandt sind, scheint die mangelnde Transformierbarkeit des Stammes C600 nicht auf die Struktur der klonierten Gene zurückzugehen, sondern in der funktionalen Analogie der Genprodukte begründet zu liegen. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden die beiden in pBN16 klonierten ϕ 3T HindIII Fragmente in pBR328 subkloniert. Die entsprechenden Rekombinantenplasmide pBN30, pBN31, pBN32 und pBN33, die diese Fragmente in jeweils beiden Orientierungen tragen, exprimieren keine Mtase Aktivitäten. Wie Tabelle VII zeigt, sind sie mit gleicher Effizienz in C600 und HB101 transformierbar.

Gezielte Klonierungsversuche in C600 waren nicht nur mit Mtase codierenden DNA-Fragmenten der WT Phagen, sondern auch mit entsprechenden Fragmenten Mtase defizienter Mutanten erfolglos verlaufen. Ein Sequenzvergleich der Mtase Gene von SPR WT und Mutanten (Buhk et al., zur Veröffentlichung eingereicht) hat ergeben, daß die Mtase Defizienz der Mutanten auf missense Mu-

Tabelle VII: Spezifische Transformationsaktivität verschiedener Hybridplasmide mit kompetenten Zellen der Stämme C600, HB101, DS410 und TC410

Plasmid	Transformanten/ μ g DNA			
	C600	HB101	DS410	TC410
pSPR5	< 10	$2,3 \times 10^4$	< 10	$3,8 \times 10^4$
pSPR7	< 10	$1,9 \times 10^4$	< 10	$4,2 \times 10^4$
pBN16	< 10	$1,7 \times 10^4$	< 10	$5,4 \times 10^4$
pBN17	< 10	$2,6 \times 10^4$	< 10	$4,8 \times 10^4$
pBN18	< 10	$7,3 \times 10^3$	< 10	$1,5 \times 10^4$
pBN19	< 10	$2,4 \times 10^4$	< 10	$7,3 \times 10^4$
pBJ20	< 10	$3,3 \times 10^4$	< 10	$9,2 \times 10^4$
pBJ21	< 10	$5,0 \times 10^4$	< 10	$1,6 \times 10^5$
pSU15	< 10	$2,2 \times 10^2$	< 10	$6,2 \times 10^4$
pBN30	$2,5 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$3,7 \times 10^3$	$4,9 \times 10^4$
pBN31	$1,3 \times 10^4$	$9,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$	$3,5 \times 10^4$
pBN32	$5,1 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4$
pBN33	$9,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$	$3,9 \times 10^3$	$3,6 \times 10^4$
pBR328	$4,1 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$

tationen beruht. Offensichtlich besitzen die veränderten Genprodukte ein zwar deutlich erniedrigtes, jedoch nicht vollständig reduziertes, sequenzspezifisches Methylierungspotential. So hat die mittlerweile erfolgte Klonierung der mutierten SPR Gene in HB101 gezeigt, daß die entsprechenden Rekombinantenplasmide auch ein begrenztes Potential zur Expression der durch Mutation betroffenen Mtase Aktivitäten besitzen (Günthert, persönliche Mitteilung). Möglicherweise hängt die Nichtklonierbarkeit mutierter Gene in C600 mit diesem reduzierten Methylierungspotential oder anderen Funktionen der Mtasen, die auch durch die veränderten Genprodukte ausgeführt werden können, zusammen.

3.10.2 Isolierung eines Mtase toleranten Derivats des minizell-produzierenden Stammes DS410

Da die Nichtklonierbarkeit der Mtase Gene in C600 offensichtlich durch den Genotyp des Wirtsstammes definiert ist, wurden Transformationsversuche mit Mtase codierenden Rekombinantenplasmiden auf weitere E. coli Stämme ausgedehnt, um zu untersuchen, ob es sich dabei um ein generelles Phänomen handelt. Außer HB101 konnte kein effizient transformierbarer E. coli Stamm gefunden werden. Dies gilt auch für den minizellproduzierenden Stamm DS410. Nach Inkubation kompetenter DS410 Zellen mit einem großen Überschuß von 20 µg pSPR7 (Abb. 17) DNA konnten jedoch 2 Transformanten isoliert werden, deren Plasmide nach wie vor die SPR Mtase Aktivitäten exprimierten (Jentsch, persönliche Mitteilung). Auf Grund des bisher geschilderten Zusammenhanges zwischen Mtase Expression und Nichttransformierbarkeit von Rekombinantenplasmiden, konnte angenommen werden, daß es sich bei den transformierten DS410 Zellen um Mutanten handelt, die sich in Hinblick auf die Toleranz gegenüber den Mtasen möglicherweise vom Parentalstamm ebenso unterscheiden wie HB101 von C600. Das konnte durch erneute Transformation von pSPR7 kurierten Derivaten dieser Zellen mit Mtase exprimierenden Rekombinantenplasmiden untersucht

werden.

Dazu wurden pSPR7 transformierte DS410 Zellen über 40 Generationen ohne selektiven Druck in L-Broth gezogen und anschließend in einer Verdünnung auf L-Platten angestrichen, die die Analyse von Einzelkolonien ermöglichte. Durch Replikaplattierung auf antibiotikafreien bzw. Amp^S-haltigen L-Platten konnte eine Amp^S-Kolonie identifiziert werden. Eine weitere Analyse dieses im folgenden als TC410 bezeichneten Stammes zeigte, daß er plasmidfrei war und weiterhin Minizellen produzierte. Wie die in Tabelle VII zusammengefaßten Transformationsexperimente mit Mtase exprimierenden Rekombinantenplasmiden zeigen, ist TC410 tatsächlich eine Mtase-tolerante Mutante des Stammes DS410. Im Gegensatz zum Parentalstamm ist TC410 durch alle Mtase exprimierenden Rekombinantenplasmide mit hoher Effizienz transformierbar. Mit der Isolierung des Stammes TC410 ist einerseits die Voraussetzung zur Minizell- Expression der klonierten Phagen Mtase Gene geschaffen. Zum anderen wird hierdurch der Zusammenhang zwischen dem Genotyp des Wirts und der Akzeptanz Mtase produzierender Rekombinantenplasmide erneut verdeutlicht.

3.11. Expression der SPR, SPB, ϕ 3T und rho 11 Mtase Gene in E. coli Minizellen.

Sequenzanalysen (Buhk et al., zur Veröffentlichung eingereicht) und Reinigungsversuche (Lauster, Günthert, unveröffentlicht) hatten gezeigt, daß beide SPR Mtase Aktivitäten auf die Wirkung eines einzigen Genproduktes zurückgehen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse ließen eine analoge Assoziation der beiden SPB, ϕ 3T bzw. rho 11 codierten Mtase Aktivitäten vermuten. Um dies zu überprüfen und einen Vergleich der Mtasen zu ermöglichen, wurde der Versuch gemacht, die klonierten Phagen Mtase Gene in E. coli Minizellen zu exprimieren.

Dazu wurden kompetente Zellen des Stammes TC410 mit pBR328 bzw. mit Rekombinantenplasmiden transformiert, die die verschiedenen Phagen Mtase Gene in jeweils beiden Orientierungen tragen. Die von allen transformierten TC410 Derivaten präparierten Minizellen wurden zur Markierung der plasmidcodierten Proteine in Gegenwart von ^{35}S -Methionin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, und die Zellysate auf 15 % Polyacrylamidgele aufgetragen.

Wie Abb. 19 zeigt, codieren die Plasmide pSPR5 und pSPR7 (Abb. 17) für ein Protein, dessen MW bei ca. 50000 liegt und damit dem auf Grund der Sequenzierungsdaten (Buhk et al., zur Veröffentlichung eingereicht) postulierten MW der SPR Mtase gut entspricht.

Vorläufige Reinigungsversuche hatten ergeben, daß die beiden ϕT Mtase Aktivitäten ebenfalls mit einem Protein verbunden sind, dessen Größe im Bereich zwischen 40 und 50 KD liegt (Günthert, persönliche Mitteilung). Wie Abb. 19 zeigt, exprimieren die Plasmide pBN16 und pBN17 nur ein Protein, dessen MW (ca. 47500) in dieser Größenordnung liegt. Ein Protein identischer Größe wird auch von den Plasmiden pBN18 und pBN19 sowie pBJ20 und pBJ21 spezifiziert, die das rho 11 bzw. SPB Mtase Gen tragen. Offensichtlich beruhen nicht nur die beiden SPR Mtase Aktivitäten, sondern auch die beiden SPB, ϕT und rho 11 codierten Aktivitäten auf der Wirkung nur eines Enzyms mit zweifachem Modifikationspotential.

Das klonierte SPR DNA Fragment einerseits und die klonierten SPB, ϕT und rho 11 Fragmente andererseits scheinen sich nicht nur in Bezug auf die Größe der von ihnen spezifizierten Genprodukte, sondern auch in Bezug auf Signalstrukturen zu unterscheiden, die die Expression der Mtase Gene in E. coli ermöglichen. Während im Falle klonierter SPR DNA eine deutlich orientierungsabhängige Intensität der Expression des Mtase

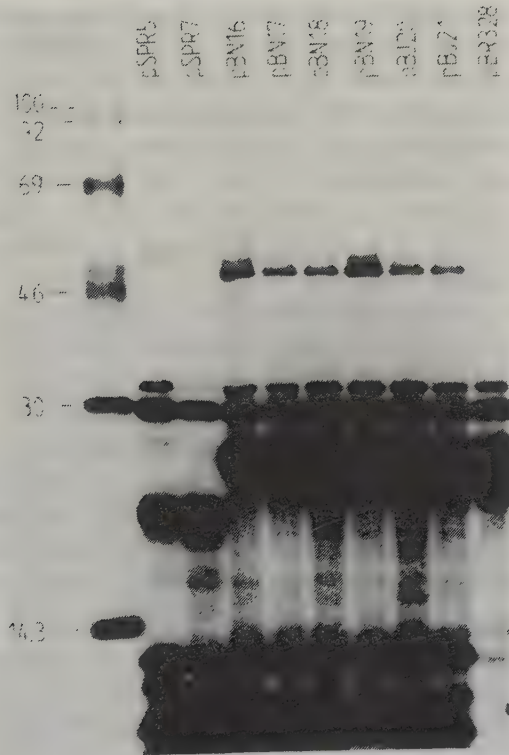


Abb. 19: Genexpression Mtase codierender Rekombinan-
tenplasmide in *E. coli* Minizellen. Der
Extrakt von Minizellen, die pBR328 enthiel-
ten, ist als Referenz aufgetragen. Die Größe
von Referenzproteinen ist in KD angegeben.

Gens zu beobachten ist, erfolgt die Synthese der SP β , ϕ 3T und rho 11 Mtasen unabhängig von der Orientierung der klonierten DNA mit gleicher Effizienz (Abb. 19). Dies läßt sich mit in vitro Restriktionsdaten der Rekombinantenplasmide korrelieren: Während pSPR5 vollständig resistent gegen HaeIII, HpaII und MspI-Restriktion ist, erweist sich pSPR7 nur partiell resistent gegenüber diesen Enzymen (Günthert, persönliche Mitteilung). Demgegenüber sind SP β , ϕ 3T und rho 11 Mtase codogene Plasmide unabhängig von der Orientierung der integrierten DNA stets vollständig resistent gegen HaeIII und Fnu4HI Degradation (Abb. 15).

4. Diskussion

Die Resistenz der temperenten B. subtilis Phagen SPR, SPB, ϕ 3T und rho 11 gegen BsuR Restriktion beruht auf der Expression phagencodierter Mtasen, die BsuR Erkennungssequenzen innerhalb der Phagen DNA methylieren. Weitere phagencodierte Mtase Aktivitäten verleihen SPR DNA Resistenz gegen HpaII/MspI Degradation, während die DNAs der Phagen SPB, ϕ 3T und rho 11 zusätzlich gegen Fnu4HI Restriktion geschützt werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß das zweifache Methylierungspotential dieser Phagen auf die Wirkung eines einzigen Genproduktes zurückgeht, also mit der Expression eines einzigen Strukturgens verbunden ist. So hat die Tatsache, daß die Mehrheit BsuR sensibler Phagenmutanten zugleich das Potential zur Expression der zweiten Mtase Aktivität verloren hat, bereits auf eine enge genetische Kopplung beider Aktivitäten hingewiesen. Diese Kopplung konnte sowohl durch in vivo Rekombinationsversuche, in deren Verlauf stets das Potential zur Expression beider Mtase Aktivitäten von Donor- auf das Rezipientengenom übertragen worden waren, als auch durch Klonierungsversuche, die in allen Fällen zur Expression beider Mtase Aktivitäten durch Hybridmoleküle geführt hatten, bestätigt werden. Darüber hinaus hat die Expression Mtase codierender Hybridplasmide in E. coli Minizellen nur zur Synthese eines zusätzlichen Genproduktes geführt, das in einem Molekulargewichtsbereich liegt, der auf Grund vorliegender Reinigungsdaten (Günthert, Lauster, persönliche Mitteilung) für die Phagen Mtasen in Frage kommt. Im Falle des Phagen SPR haben mittlerweile vorliegende Sequenzierungsanalysen (Buhk et al., zur Veröffentlichung eingereicht) die Annahme eines einzigen Mtase Gens bestätigt, wobei das aus der Sequenz berechnete MW der SPR Mtase von ca. 49900 mit dem MW des in E. coli Minizellen synthetisierten Genproduktes von ca. 50000 gut übereinstimmt. Die Identität dieses Genproduktes mit der gereinigten SPR Mtase konnte gezeigt werden (Lauster, pers. Mitteilung). Die Expression SPB, ϕ 3T und rho 11 Mtase codierender Hybridplasmide

in E. coli Minizellen führte in allen Fällen zur Synthese eines Produktes mit einem etwas niedrigeren MW von ca. 47500. Dieses MW stimmt mit dem durch immunologische Methoden ermittelten MW der ϕ 3T Mtase überein (Lauster, pers. Mitteilung).

Vergleicht man Größe und Methylierungskapazität der in E. coli Minizellen synthetisierten Genprodukte, so deutet sich bereits die Verwandtschaft der SPB, ϕ 3T und rho 11 Mtasen einerseits und ihre Verschiedenartigkeit gegenüber der SPR Mtase andererseits an. Untersuchungen, die sich auf die Struktur der entsprechenden Mtase Gene bezogen, konnten das bestätigen. So haben die Ähnlichkeit der Restriktionskarten Mtase codierender DNA Fragmente sowie ihre intensive Kreuzhybridisierung die enge Verwandtschaft der SPB, ϕ 3T und rho 11 Mtase Gene erwiesen. Dagegen konnte ein deutlicher Unterschied zwischen diesen Genen und dem SPR Mtase Gen festgestellt werden. Dies ergibt sich bereits aus einem Vergleich der Restriktionskarten SPR und SPB/ ϕ 3T/rho 11 Mtase codierender DNA Fragmente, die keine Ähnlichkeit miteinander aufweisen. Besonders deutlich kommt die Verschiedenartigkeit der Gene jedoch in Hybridisierungsversuchen zum Ausdruck, bei denen keine Kreuzhybridisierung zwischen dem SPR Mtase Gen und den Mtase Genen heterologer Phagen beobachtet werden konnte.

Die durch in vitro Analysen Mtase codierender DNA Fragmente festgestellte Unterschiedlichkeit zwischen dem SPR Mtase Gen und den SPB/ ϕ 3T/rho 11 Mtase Genen konnte durch Rekombinationsversuche in vivo bestätigt werden. MR Versuche mit Mtase defizienten Mutanten von SPR und ϕ 3T hatten gezeigt, daß es offensichtlich keine intragenischen Rekombinationsereignisse zwischen den mutierten, heterologen Mtase Genen gibt, die die Etablierung eines funktionalen Gens erlauben.

Interessanterweise besteht zwischen einer Flanke aller Mtase Gene intensive Homologie, wobei sich entsprechende Sequenzen

auch im Genom des nichtmodifizierenden Phagen Z finden (Kupsch, persönliche Mitteilung). Möglicherweise sind diese Strukturen an Rekombinationsereignissen, die die Mtase Gene betreffen, beteiligt. Da sie dem Translationsstoppsignal des SPR Mtase Gens folgen und da sie sich über einen längeren Bereich der Phagengenome ausdehnen (Kupsch, persönliche Mitteilung), ist es wenig wahrscheinlich, daß es sich dabei um allen Phagen gemeinsame Sequenzen handelt, die in die Expression der Mtase Gene involviert sind. Vielmehr scheinen sich in unmittelbarer Umgebung der Mtase Gene funktional analoge, in allen Phagen konservierte Gene zu befinden. Möglicherweise sind die Mtase Gene Bestandteil eines Clusters früher Gene, der koordiniert exprimiert wird. Da auf Grund der engen Verwandtschaft der Phagen mit einer prinzipiell ähnlichen funktionalen Organisation ihrer Genome gerechnet werden kann, deutet auch die ähnliche Position der Mtase Gene innerhalb der Phagengenome in diese Richtung. Sicherlich wäre es interessant zu wissen, ob die Transkription der Mtase Gene in der Synthese eines mono- oder polycistronischen Messengers mündet. Die Hybridisierung markierter Mtase Gene gegen mRNA, die aus induzierten phagenlysogenen Zellen präpariert wurde, könnte zur Beantwortung dieser Frage beitragen.

Obwohl auf Grund der vorliegenden Ergebnisse die ursprüngliche Annahme weitgehender Homologie zwischen dem SPR Mtase Gen und den SPB/ ϕ 3T/rho 11 Mtase Genen (Noyer-Weidner et al., 1983), die auf der intensiven Hybridisierung unmittelbar flankierenden Bereiche der Mtase Gene beruhte, revidiert werden muß, kann dennoch mit struktureller Verwandtschaft zwischen dem SPR Mtase Gen und den Mtase Genen von SPB, ϕ 3T und rho 11 gerechnet werden. So haben immunologische Untersuchungen eine deutliche serologische Kreuzreaktion zwischen den SPR und ϕ 3T Mtasen ergeben (Lauster, pers. Mitteilung). Offensichtlich haben sich die Mtase Gene von SPR einerseits und SPB, ϕ 3T und rho 11 andererseits divergent entwickelt. Die Konservierung eines zweifachen Methylierungspotentials und die analoge Gene-

tik der SPR und ϕ 3T Mtasen deuten darauf hin, daß im Verlauf dieser Entwicklung die Grundstruktur der Mtasen und ihrer genetischen Determinanten gewahrt blieb. Detailliertere Untersuchungen zu dieser Frage können erst nach einem Sequenzvergleich des SPR Mtase Gens (Buhk et al., zur Veröffentlichung eingereicht) und des ϕ 3T Mtase Gens (Sequenzierung geplant) vorgenommen werden.

Unter den gegebenen Hybridisierungsbedingungen läßt sich keine Homologie zwischen den Phagen Mtase Genen und den Mtase Genen verschiedener R/M Systeme des Wirts feststellen. Klonierte, Mtase codierende ϕ 3T oder SPR DNA Fragmente hybridisieren weder gegen das Mtase Gen des BsuR Systems (Trautner et al., 1974) noch gegen das Mtase Gen des vermutlich allelischen BsuF Systems (Ikawa et al., 1980), obwohl die Sequenzspezifitäten dieser Systeme mit denen phagencodierter Mtasen übereinstimmen (Jentsch, 1983). Dieses Ergebnis, das mit Hybridisierungsversuchen zwischen den klonierten SPR und BsuR Mtase Genen (Kiss und Baldauf, 1983) in Einklang steht, deutet auf eine konvergente oder massiv divergente Entwicklung der Phagen Mtase Gene und der bakteriellen Mtase Gene hin. Insofern ergibt sich ein deutlicher Unterschied zu den Thymidylat Synthetase Genen dieser Phagengruppe (Tabelle I), die eng mit dem bakteriellen Thymidylat Synthetase Gen ThyA verwandt sind (Tucker, 1969; Duncan et al., 1978; Stroynowski, 1981a und 1981b).

Wenn die Herkunft der Mtase Gene auch unklar bleibt, so können sie dennoch, ähnlich wie das für die Thymidylat-Synthetase Gene diskutiert wird (Stroynowski, 1981a und 1981b), durch Rekombination innerhalb dieser Phagengruppe Verbreitung gefunden haben. So haben MR Versuche gezeigt, daß die Mtase Gene heterologer, modifizierender Phagen austauschbar sind und auch auf das Genom des nichtmodifizierenden Phagen Z übertragen werden können. Offenbar besteht in dieser Phagengruppe generell die Möglichkeit eines intensiven genetischen Austausches.

So haben einige der hier beschriebenen Rekombinationsereignisse auch Determinanten des Serotyps betroffen. Darüber hinaus haben Versuche von H. E. Hemphill (zitiert nach Zahler, 1982) gezeigt, daß temperatursensitive (ts) Mutanten aller Phagen dieser Gruppe mit ts Mutanten aller heterologen Phagen zu ts⁺ Phagen rekombinieren können.

Daraus ergeben sich allerdings Probleme, die sowohl die Interpretation von Versuchsergebnissen als auch die Systematik dieser Phagengruppe selbst betreffen. Bis zur Entdeckung des Phagen SPB (Warner et al., 1977) und auch noch danach wurden die Phagen ϕ 3T und rho 11 häufig auf SPB lysogenen Stämmen gezogen. So ist z.B. die bei der Etablierung einer Restriktionskarte beobachtete Variabilität des ϕ 3T Genoms (Cregg und Ito, 1979) mit großer Wahrscheinlichkeit auf Rekombination zwischen ϕ 3T und SPB zurückzuführen. Im Verlauf der hier beschriebenen Arbeiten, die mit einem SPB freien Stamm durchgeführt wurden, konnte keine Instabilität des ϕ 3T Genoms beobachtet werden. Zweifelhaft bleibt auch, inwieweit die Phagen ϕ 3T und rho 11, die sich in erster Linie durch ihr Restriktionsmuster unterscheiden (Dean et al., 1976), zu Recht als verschiedene Phagen geführt werden.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit betrifft die Signalstrukturen, von denen die Expression der phagencodierten Mtase Gene ausgeht. Promotorsequenzen, die von der in vegetativen Zellen dominierenden Form der B. subtilis RNA Polymerase (σ^{55} -RNA Polymerase) erkannt werden, zeigen weitgehende Übereinstimmung mit der für E. coli Promotoren etablierten Konsensussequenz (Rosenberg und Court, 1979; Moran et al., 1982). Daneben wurden in B. subtilis jedoch eine Reihe von Promotoren mit stark abweichender Sequenz charakterisiert (Zusammenfassung Johnson et al., 1983), die Sporulationsgenen oder Phagengenen zugehörig sind. Sie können von der σ^{55} -RNA-Polymerase nicht erkannt werden. Transkription ausgehend von diesen Promotoren erfolgt entweder nach Veränderung der Promotorerkennungsspezi-

fität der Wirts RNA Polymerase durch Interaktion mit unterschiedlichen σ -Faktoren (Übersichtsartikel von Losick und Pero, 1981) oder nach Synthese einer phagencodierten RNA Polymerase (Clark et al., 1974; Clark, 1978). Aus diesen Gründen ist bei Klonierung von B. subtilis Phagengenen im homologen wie auch im heterologen Wirt nicht unbedingt damit zu rechnen, daß die Transkription der Gene von den in vivo genutzten Promotoren ausgeht, auch wenn diese auf den klonierten Fragmenten lokalisiert sind.

In dieser Hinsicht hat die Klonierung der Phagen Mtase Gene zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt. So hat die Insertion Mtase codierender SPB, ϕ 3T und rho 11 Fragmente in die HindIII Schnittstelle von pBR328 eine orientierungsunabhängige, effiziente Expression der Mtase Aktivitäten ergeben. Dies wird sowohl durch in vitro Restriktion als auch durch Minizellexpression der Rekombinantenplasmide belegt. Auf Grund der bisher erfolgten Charakterisierung von Vektorpromotoren (Stüber und Bujard, 1981; Brosius et al., 1982) ist es sehr wahrscheinlich, daß die Orientierungsunabhängigkeit der Expression auf Promotoren bzw. promotorähnliche Strukturen zurückgeht, die auf den klonierten Fragmenten lokalisiert sind.

Demgegenüber zeigt die Expression des in die EcoRI Schnittstelle von pBR322 klonierten SPR Mtase Gens starke Orientierungsabhängigkeit. Effiziente Expression erfolgt nur in der Orientierung (pSPR5, Abb. 17), in der der Mtase codogene Strang (Montenegro et al., 1983) unter Kontrolle des Vektorpromotors P1 (Stüber und Bujard, 1981; Brosius et al., 1982) gerät. In der Gegenorientierung (pSPR7, Abb. 17) ist die Expression deutlich herabgesetzt. Wie neuere Ergebnisse zeigen (Prada, pers. Mitteilung), geht die Transkription in dieser Orientierung ausschließlich von dem bei Phagenentwicklung genutzten Promotor aus, der sich in unmittelbarer Nähe des SPR Mtase Gens befindet (Buhk et al., eingereicht zur Veröffentlichung). Die Affinität dieses Promotors zur E. coli

RNA-Polymerase scheint jedoch gering zu sein. Dies könnte darin begründet liegen, daß eine effiziente Transkription des SPR Mtase Gens, ausgehend von dem in vivo genutzten Promotor, erst nach Modifikation der B. subtilis RNA Polymerase durch einen SPR codierten σ -Faktor bzw. nach Synthese einer SPR spezifischen RNA Polymerase erfolgen kann.

Auf Grund der höheren Affinität der auf den SPB, ϕ 3T und rho 11 Fragmenten lokalisierten Promotoren zur E. coli RNA Polymerase kann vermutet werden, daß ihre Sequenzen größere Übereinstimmung mit der Konsensussequenz von E. coli Promotoren (Rosenberg und Court, 1979) zeigen, als der auf dem SPR Fragment lokalisierte Promotor. Obwohl sie daher potentiell auch durch die σ^{55} -RNA-Polymerase vegetativer B. subtilis Zellen erkannt werden sollten, schließt dies nicht aus, daß auch die Phagen SPB, ϕ 3T und rho 11 für σ -Faktoren bzw. RNA Polymerasen codieren, die für eine effiziente Transkription der Mtase Gene in vivo benötigt werden. Sicherlich wäre es interessant zu wissen, ob die Transkription der Gene dieser Phagengruppe auch in Gegenwart von Inhibitoren der Wirts-RNA-Polymerase (z.B. Rifampicin) erfolgen kann, wie dies für den B. subtilis Phagen PBS2 nachgewiesen werden konnte (Price und Frabotta, 1972; Price et al., 1974).

Im Unterschied zur Klonierung in Plasmidvektoren führte die Klonierung der SPR und ϕ 3T Mtase Gene in Phagenvektoren (Behrens et al., 1983; Montenegro et al., 1983; diese Arbeit Abschnitt 3.7) in keinem Fall zu vollständiger Modifikation der Hybridgenome. Die Ursachen hierfür könnten in einer geringeren Produktion der Mtasen durch die Hybridphagen begründet liegen. Da es sich bei den Hybridphagen um virulente Phagen bzw. Phagenderivate handelt, könnte jedoch auch die limitierte Interaktionsmöglichkeit von Mtase und Hybrid DNA eine Rolle spielen, die auf den Zeitraum zwischen der Mtase Expression nach Infektion und der Verpackung der Hybrid DNA vor Zellyse beschränkt ist.

Im Zusammenhang mit der Diskussion möglicher Signalstrukturen, von denen die Expression der Phagen Mtase Gene ausgeht, steht auch die Frage nach der Regulation dieser Expression. Während die Gene im lysogenen Zustand reprimiert sind (Jentsch, 1982), scheinen sie sowohl bei lytisch verlaufender Infektion, wie dies im Falle des Phagen ϕ 3T gezeigt werden konnte (Cregg et al., 1980), als auch nach Induktion des Prophagen (Günthert, Trautner, persönliche Mitteilung) als frühe Funktionen effizient exprimiert zu werden. Möglicherweise steht die Regulation ihrer Expression daher unter direkter Kontrolle des Phagenrepressors. Die Umklonierung der Mtase codierenden DNA Fragmente in B. subtilis Plasmidvektoren und die anschließende Transformation der Rekombinationsplasmide in lysogene und nichtlysogene Zellen könnten einen Ansatz dazu bieten, diese Frage zu beantworten.

Neben Fragen, die die Expression betreffen, hat die Klonierung der Phagen Mtase Gene im heterologen Wirt noch einen weiteren, interessanten Aspekt ergeben. Die Klonierung in high-copy-number Plasmiden konnte nur im Stamm HB101 erfolgreich durchgeführt werden. Dagegen toleriert die Mehrheit der E. coli Stämme, wie z.B. C600 oder DS410, die Mtase codierenden Rekombinantenplasmide offensichtlich nicht. So haben Transformationsexperimente gezeigt, daß diese Stämme nicht mit Rekombinantenplasmiden transformiert werden können, die die Mtase Gene der Phagen oder des bakteriellen BsuR Systems tragen. Da sich die Mtase Gene der Phagen sowohl untereinander als auch gegenüber dem Mtase Gen des BsuR Systems in ihrer Struktur unterscheiden, deutet dieses Ergebnis bereits an, daß die Klonierungsprobleme nicht auf strukturellen Eigenschaften der Mtase Gene sondern auf funktionalen Analogien ihrer Produkte beruhen. Mehrere Befunde bestärken diese Annahme: Rekombinantenplasmide, in die Teilfragmente einkloniert wurden, die den gesamten Bereich der in C600 nichtklonierbaren Mtase codierenden Fragmente abdecken, können sowohl HB101 als auch C600 effizient transformieren. Wie Restriktionsanalysen zeigten, ex-

primiert keines dieser Plasmide Mtase Aktivität. Ebenso kann ein Rekombinantenplasmid, das die beiden in pBJ20 klonierten HindIII Fragmente (Abb. 13) in gegeneinander invertierter Orientierung trägt, in C600 transformiert werden (Jentsch, persönliche Mitteilung). Auch dieses Plasmid exprimiert keine Mtase Aktivitäten. Der klarste Einwand gegen strukturelle Ursachen der Klonierungsprobleme ergibt sich jedoch aus Klonierungsversuchen, die mit einem low-copy-number Plasmid durchgeführt wurden (Jentsch, unveröffentlicht): Hier gelang es, ein SPR Mtase codierendes Fragment, das in high-copy-number Plasmiden nicht zu klonieren war, erfolgreich in C600 zu klonieren, allerdings auch nur in derjenigen Orientierung, in der sich keine Expression der Mtase Aktivitäten feststellen ließ. Wollte man dennoch strukturelle Ursachen für die Klonierungsprobleme geltend machen, so könnten diese nicht in der Primär-, sondern allenfalls in der Sekundärstruktur der Mtase Gene begründet liegen. Da die Nichtklonierbarkeit in C600 jedoch auf Mtase Gene unterschiedlicher Primärstruktur zutrifft, ist es äußerst unwahrscheinlich, daß sie alle eine ähnliche, offenbar hochspezifische Sekundärstruktur einnehmen.

Wenn also die Ursache der Nichtklonierbarkeit in der Produktion der Mtasen gesucht werden muß, so ergibt sich die Frage, welche ihrer Funktionen für den toxischen Effekt auf den Wirt verantwortlich ist. Obwohl allen hier beschriebenen Mtasen das Potential zu GGCC spezifischer Methylierung gemeinsam ist, ist es dennoch zu bezweifeln, daß die Modifikation von GGCC Sequenzen lethal für den Wirt ist. Hiergegen spricht vor allem, daß die Klonierungsproblematik auch auf DNA Fragmente zutrifft, die die Mtase Gene von Phagen tragen, deren Methylierungspotential erheblich eingeschränkt ist.

Wie die mittlerweile vorliegenden Sequenzierungsdaten von SPR WT und SPR Mutantengenen (Buhk et al., eingereicht zur Veröffentlichung) gezeigt haben, beruht das eingeschränkte Methylierungspotential der Mutanten auf missense Mutationen. Es

kommt daher also weiterhin zur Synthese von Genprodukten, die über weite Bereiche (ihrer Primärsequenz) mit den funktionalen Mtasen identisch sind. Es ist daher durchaus möglich, daß diese Proteine weiterhin zur Durchführung allgemeiner Mtase Funktionen, wie SAM-Bindung oder Interaktion mit DNA, in der Lage sind. Im Falle von Mutationen, die nur eine der beiden Sequenzspezifitäten der Mtasen betroffen haben, muß dies sogar vorausgesetzt werden. Möglicherweise sind also diese allgemeinen Funktionen für die Klonierungsprobleme verantwortlich.

Allerdings ist es unwahrscheinlich, daß die SAM Bindungskapazität der Mtasen, die zu einer Reduktion des internen SAM Pools führen könnte, ausschlaggebend für die Nichtklonierbarkeit der Mtase Gene ist. Wie die Klonierung des EcoRII R/M Systems auf einem high-copy-number Plasmid in C600 (Kosykh et al., 1980) beweist, verträgt dieser Stamm durchaus eine deutliche Beanspruchung seines SAM-Pools.

Zieht man dagegen in Betracht, daß die Klonierungsprobleme durch die Fähigkeit der Mtasen, an DNA zu binden, verursacht werden, so läßt sich unter diesem Aspekt sowohl die Nichtklonierbarkeit der WT als auch der Mutantengene erklären. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang ein Ergebnis, dessen Darstellung in diese Arbeit nicht mehr eingegangen ist. Auch ein Fragment, das ein Derivat des SPR Mtase Gens trägt, in dessen Zentrum ein Translationstoppsignal eingefügt worden ist (Buhk et al., zur Veröffentlichung eingereicht), kann nur in HB101, nicht jedoch in C600 erfolgreich kloniert werden. Rekombinantenplasmide, die dieses Fragment tragen, können weiterhin die Expression der N-terminalen Hälfte des SPR Mtase Gens (Größe des verkürzten Proteins ca. 28 KD gegenüber 49.9 KD des WT Enzyms) ermöglichen (Buhk et al., eingereicht zur Veröffentlichung). Interessanterweise wird im N-terminalen Bereich der SPR Mtase eine Domäne des Enzyms vermutet, die für die Durchführung genereller Reaktionen, wie SAM oder DNA Bindung, verantwortlich ist (Buhk et al., eingereicht zur Veröf-

fentlichung). Obwohl das N-terminale Derivat der SPR Mtase nur noch äußerst geringfügige, offenbar nicht mehr sequenzspezifische Methylierungskapazität besitzt (Günthert, persönliche Mitteilung), ist es durchaus denkbar, daß weiterhin ein signifikantes Potential zur DNA Bindung besteht. Natürlich können die bisher vorliegenden Ergebnisse nicht mit Sicherheit ausschließen, daß DNA Methylierung oder SAM Bindung für die Klonierungsprobleme verantwortlich sind. Gerade für das zuletzt dargestellte Ergebnis scheint jedoch die Annahme, daß die Klonierungsprobleme mit der Bindung der Mtasen an die Wirts DNA zusammenhängen, die beste Erklärungsmöglichkeit zu bieten.

Welche Funktion der Mtasen auch immer für die Nichtklonierbarkeit der Mtase Gene in Stämmen wie C600 oder DS410 ausschlaggebend ist: Es gibt offensichtlich Mutationen des Wirtsgenoms, durch die dieser Effekt aufgehoben wird. So könnte die Reduktion des SAM Pools durch eine Mutation, die zur SAM-Überproduktion führt, kompensiert werden. Die mögliche Behinderung der Funktion eines Wirtsproteins durch DNA Methylierung könnte durch Synthese eines veränderten Proteins aufgehoben werden. Sollte die Nichtklonierbarkeit der Mtase Gene tatsächlich auf der Fähigkeit der Mtasen beruhen, an DNA zu binden, so ist es - ähnlich wie im Falle eines toxischen Effektes von DNA Methylierung - denkbar, daß diese Bindung mit der Funktion eines Wirtsproteins interferiert. Auch hier könnte durch Mutation ein verändertes Protein geschaffen werden, das in seiner Funktion nicht durch die an die DNA gebundenen Mtase Moleküle behindert wird. Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, daß die Bindung der WT und Mutanten Mtasen an die Wirts DNA sequenzspezifisch erfolgt, wobei nur eine der zahlreichen Bindungen, etwa durch Blockade der Expression eines Gens, toxisch für den Wirt ist. Eine Mutation in dieser einen Sequenz könnte die Bindung der Mtasen an dieser Stelle verhindern und somit ihre lethale Wirkung aufheben.

Mehrere Versuche bieten sich an, um die möglichen Ursachen der Klonierungsprobleme weiter einzugrenzen. So sollte im Hinblick auf die hier vorgestellte Hypothese untersucht werden, ob das auf die N-terminale Hälfte der SPR Mtase verkürzte Protein weiterhin DNA Bindungsaktivität besitzt. Da die Nichtklonierbarkeit mit der Funktion der Mtasen zusammenhängt, sollten in C600 transformierbare Plasmide, die Teilfragmente der Mtase codierenden Segmente enthalten, für kein Genprodukt bzw. für ein funktionsunfähiges Genprodukt codieren. Minizellexpression dieser Rekombinantenplasmide könnte Aufschluß darüber geben, ob das zutrifft. Auch die beschriebene Isolierung Mtase toleranter Mutanten von C600 und DS410 könnte durch einen Vergleich der Physiologie von WT und Mutantenstämmen (z.B. im Hinblick auf SAM Produktion) sowie die Kartierung des Mutationsorts einen Beitrag zur Aufklärung des Problems leisten. Schließlich wäre es auch interessant zu wissen, ob die Expression heterologer Mtasen in C600 generell problematisch ist. Hierzu bietet sich die Transformation von C600 mit Hybridplasmiden an, die für Mtasen anderer Erkennungsspezifität codieren. Aus der Literatur geht nicht hervor, ob dies möglich ist, da bei Klonierung heterologer Mtase Gene oder R/M Systeme in E. coli Plasmidvektoren (Mann et al., 1978; Szomolanyi et al., 1980; Walder et al., 1981; Januleitis et al., 1982; Theriault und Roy, 1982; Kiss and Baldauf, 1983; Gengeras und Brooks, 1983; Schoner et al., 1983) ausschließlich die Stämme HB101 (Boyer and Roulland-Dussoix, 1969) oder MM294 (Backman et al., 1976) benutzt wurden, wobei unklar ist, ob beide Stämme einen gemeinsamen genetischen Hintergrund haben. Zabeau et al. (1979) berichten von fehlgeschlagenen Versuchen verschiedene heterologe R/M Systeme in E. coli zu klonieren, machen jedoch keine Angaben über den zur Klonierung benutzten Wirtsstamm.

Die Probleme, die durch Expression der Phagen Mtase Gene im heterologen Wirt verursacht werden, leiten über zur Frage nach der physiologischen Funktion der phagencodierten Mtasen im ho-

mologen System. Ausschlaggebend für ihre Entdeckung war die Resistenz der Phagen SPR, SPB, ϕ 3T und rho 11 gegen BsuR Restriktion in vivo (Trautner et al., 1980; Cregg et al., 1980; Noyer-Weidner et al., 1981; Noyer-Weidner et al., 1983). Inzwischen konnte auch der zweiten Mtase Aktivität des Phagen SPR eine Schutzfunktion gegen Restriktion durch das BsuF System zugewiesen werden (Jentsch, 1983), während die Funktion der zweiten, Fnu4HI spezifischen Mtase Aktivität der Phagen SPB, ϕ 3T und rho 11 noch unklar ist. Möglicherweise gibt es in B. subtilis oder anderen Bacillus Spezies, die als potentielle Wirte dieser Phagen in Frage kommen (Stroynowski, 1981a), ein bisher noch unentdecktes R/M System mit Fnu4HI Spezifität. Doch auch dann bleibt es fraglich, ob die Funktion der phagencodierten Mtasen mit ihrer antirestriktiven Wirkung erschöpfend charakterisiert ist. Zwar weisen die Existenz des nichtmodifizierenden Phagen Z sowie die Isolierung Mtase defizienter Mutanten auf den nichtessentiellen Charakter dieser Gene hin. Andererseits deutet die konvergent oder divergent erfolgte Entwicklung der SPR bzw. SPB, ϕ 3T und rho 11 Mtasen, bei der ein zweifaches Methylierungspotential dieser Enzyme evolviert bzw. konserviert wurde, auf einen Selektionsdruck hin, der mit antirestriktiver Funktion alleine schwer begründet werden kann. Möglicherweise erfüllen diese Mtasen noch weitere Funktionen, wie sie für prokaryontische DNA Methylierung etwa im Zusammenhang mit Reparatur (Glickmann und Radmann, 1980; Lu et al., 1983; Pukkila et al., 1983), Rekombination (Korba und Hays, 1982a und 1982b), Replikation (Billen, 1968; Lark, 1968; Lark, 1979) und Kontrolle der Genexpression (Kahmann, 1982; Hatmann et al., 1982) beschrieben worden sind. Allerdings wird eine Analyse derartiger potentieller Funktionen dadurch erschwert, daß über die Genetik dieser Phagen insgesamt bisher noch wenig bekannt ist.

5. Zusammenfassung

Die Resistenz der temperenten B. subtilis Phagen SPR, SPB, ϕ 3T und rho 11 gegen BsuR Restriktion geht auf phagencodierte, BsuR spezifische Mtase Aktivitäten zurück. Weitere phagencodierte Mtase Aktivitäten bewirken Resistenz gegenüber HpaII/MspI (SPR) bzw. Fnu4HI (SPB, ϕ 3T, rho 11) Degradation. In allen Fällen ist das mehrfache Methylierungspotential dieser Phagen auf die Wirkung eines einzigen Modifikationsenzym zurückzuführen. Minizellexpression Mtase codierender Rekombinantenplasmide ergibt für die SPR Mtase ein MW von ca. 50.000, für die Mtasen der Phagen SPB, ϕ 3T und rho 11 ein MW von ca. 47.500. Im Gegensatz zu SPR, SPB, ϕ 3T und rho 11 exprimiert der mit ihnen eng verwandte Phage Z keine Mtase Aktivitäten.

Hybridisierungsversuche, die mit klonierten, Mtase codierenden DNA Fragmenten durchgeführt wurden, zeigen, daß die Mtase Gene der Phagen SPB, ϕ 3T und rho 11 eng verwandt sind. Dagegen konnte unter stringenten Bedingungen keine Homologie zwischen diesen Genen und dem SPR Mtase Gen gefunden werden. Alle Mtase Gene werden jedoch von einem intensiv homologen Bereich flankiert, wobei sich entsprechende Sequenzen auch im Genom des nichtmodifizierenden Phagen Z finden. Möglicherweise ist dieser Bereich an Rekombinationsereignissen beteiligt, die den Austausch der Mtase Gene untereinander sowie ihre Übertragung auf das Z Genom ermöglichen. Unter den gegebenen Hybridisierungsbedingungen läßt sich keine strukturelle Verwandtschaft zwischen Phagen Mtase Genen und Mtase Genen wirtscodierter R/M Systeme nachweisen.

Klonierung Mtase codierender Fragmente führt im homologen Wirt und im heterologen Wirt E. coli zur Expression der phagencodierten Mtase Aktivitäten. Aus den Klonierungsexperimenten kann geschlossen werden, daß die Transkription der Mtase Gene

von Promotoren ausgeht, die in ihrer unmittelbaren Nähe lokalisiert sind.

Die Klonierung der Mtase Gene in E. coli konnte nur im Stamm HB101 erfolgreich durchgeführt werden. Andere Stämme tolerieren die Mtase codierenden Hybridplasmide nicht. Strukturelle Ursachen hierfür können ausgeschlossen werden.

6. Literatur

- Adams, M. H.: Bacteriophages, Interscience Publ., New York (1959)
- Appleyard, R. K.: Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from E. coli K12. Genetics 39, 440 - 452 (1954)
- Arber, W.: The role of methionine in the production of host specificity. J. Mol. Biol. 11, 247 - 256 (1965).
- Backman, K., Ptashne, M., Gilbert, W.: Construction of plasmids carrying the cI gene of bacteriophage λ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4174 - 4178 (1976)
- Behrens, B., Lüder, G., Behncke, M., Trautner, T. A., Ganesan, A. T.: The genome of B. subtilis phage SPP1. Physical arrangement of phage genes. Mol. Gen. Genet. 175, 351 - 357 (1979)
- Behrens, B., Pawlek, B., Mörelli, G., Trautner, T. A.: Restriction and modification in Bacillus subtilis: Construction of hybrid λ and SPP1 phages containing a DNA methyltransferase gene from B. subtilis phage SPR. Mol. Gen. Genet. 189, 10 - 16 (1983)
- Bickle, T. A. : The ATP-dependent restriction endonucleases, p. 85 - 108. In Linn, S.M., and Roberts, R.J. (eds.): Nucleases. Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
- Billen, D.: Methylation of the bacterial chromosome: An event at the "replication point"? J. Mol. Biol. 31, 477 - 486 (1968).
- Birnboim, H. C., Doly, J.: A rapid alkaline extraction proce-

- ture for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids. Res. 7, 1513 - 1523 (1979)
- Biswal, N., Kleinschmidt, A. K., Spatz, H. Ch., Trautner, T. A.: Physical properties of the DNA of bacteriophage SP50. Mol. Gen. Genet. 100, 39 - 55 (1967).
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Green, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H., Boyer, H. W.: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene 2, 95 - 113 (1977)
- Bonner, W. M., Laskey, R. A.: A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem. 46, 83 - 88 (1974).
- Boyer, H. W., Roulland-Dussoix, D.: A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 41, 459 - 472 (1969).
- Brosius, J., Cate, R. L., Perlmutter, A. P.: Precise location of two promoters for the β -lactamase gene of pBR322, J. Biol. Chem. 257, 9205 - 9210 (1982).
- Brown, M. G. M., Weston, A., Saunders, J. R., Humphreys, G. O.: Transformation of Escherichia coli C600 by plasmid DNA at different phases of growth. FEMS Microbiol. Lett. 5, 219 - 222 (1979).
- Buhk, H.-J., Behrens, B., Tailor, R., Wilke, K., Prada, J. J., Günthert, U., Noyer-Weidner, M., Jentsch, S., Trautner, T. A.: Restriction and modification in Bacillus subtilis: Nucleotide sequence, functional organization and product of the DNA methyltransferase gene of bacteriophage SPR. Gene, eingereicht zur Veröffentlichung (1984).

- Christen, A. A., Poll, M. L., Manzara, T., Lurquin, P. F.: Rapid isolation of Escherichia coli minicells by glass-fiber filtration: study of plasmid-coded polypeptides. Gene 23, 195 - 198 (1983).
- Clark, S., Losick, R., Pero, J.: New RNA polymerase from Bacillus subtilis infected with phage PBS2. Nature 252, 21 - 24 (1974).
- Clark, S.: Transcriptional specificity of a multisubunit RNA polymerase induced by Bacillus subtilis bacteriophage PBS2. J. Virol. 25, 224 - 237 (1978).
- Claverys, J. P., Louran, I. M., Sicard, A. M.: Cloning of Streptococcus pneumoniae DNA: its use in transformation. In: Polsinelli, M., Mazza, G. (eds.) Transformation 1980. Proceedings of the Fifth European Meeting on Bacterial Transformation and Transfection, Florence. Cotswold Press Ltd., Oxford U.K., p.215 (1981).
- Cregg, J. M., Ito, J.: A physical map of the genome of the temperate phage ϕ 3T. Gene 6, 199 - 219 (1979).
- Cregg, J. M., Nguyen, A. H., Ito, J.: DNA modification induced during infection of Bacillus subtilis by phage ϕ 3T. Gene 12, 17 - 24 (1980).
- Dean, D. H., Orrego, J. C., Hutchinson, K. W., Halvorson, H. O.: New temperate bacteriophage for Bacillus subtilis rho 11. J. Virol. 20, 509 - 519 (1976).
- Doerfler, W.: DNA methylation and gene activity. Ann. Rev. Biochem. 52, 93 - 124 (1983).
- Dougan, G., Sherratt, D.: The transposon Tn1 as a probe for studying ColE1 structure and function. Mol. Gen. Genet. 151 - 160 (1977).

- Duncan, C. H., Wilson, G. A., Young, F. W.: Mechanism of integrating foreign DNA during transformation of Bacillus subtilis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 3664 - 3668 (1978).
- Fink, P. S. Zahler, S. A.: Restriction fragment maps of the genome of Bacillus subtilis bacteriophage SPB. Gene 19, 235 - 238 (1982)
- Gingeras, T. R., Brooks, J. E.: Cloned restrictionmodification system from Pseudomonas aeruginosa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 402 - 406 (1983)
- Glickman, B. W., Radman, M.: Escherichia coli mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch correction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1063 - 1065 (1980).
- Günthert, U., Freund, M., Trautner, T. A.: Restriction and modification in Bacillus subtilis: Two DNA methyltransferases with BsuRI specificity. J. Biol. Chem. 256, 9340 - 9345 (1981).
- Hattman, S., Goradia, M., Monaghan, C., Bukhari, A. I.: Regulation of the DNA-modification function of bacteriophage Mu. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 47, 647 - 653 (1982).
- Heilmann, H., Reeve, J.: Construction and use of SPP1v, a viral cloning vector for Bacillus subtilis. Gene 17, 91 - 100 (1982).
- Hemphill, H. E., Gage, I., Zahler, S. A., Korman, R.: Prophage-mediated production of a bacteriocinlike substance by SPB lysogens of Bacillus subtilis. Can. J. Microbiol. 26, 1328 - 1333 (1980).

- Ikawa, S., Shibata, T., Ando, T., Saito, H.: Genetic studies on site-specific endodeoxyribonucleases in B. subtilis: Multiple modification and restriction systems in transformants of Bacillus subtilis 168. Mol. Gen. Genet. 177, 359 - 368 (1980).
- Ikawa, S., Shibata, T., Matsumoto, K., Iijima, T., Saito, H., Ando, T.: Chromosomal loci of genes controlling site-specific restrictionendonucleases of Bacillus subtilis. Mol. Gen. Genet. 183, 1 - 6 (1981)
- Januleitis, A., Povilionis, P., Sasnauskas, K.: Cloning of the modification methylase gene of Bacillus centrosporus in Escherichia coli. Gene 20, 197 - 204 (1982).
- Jentsch, S., Pawlek, B., Noyer-Weidner, M., Günthert, U., Trautner, T. A.: Restriction and modification in Bacillus subtilis: Temperate phages SPB and ø3T code for BsuR specific methyltransferases. In: Polsinelli, M., Mazza, G. (eds) Proc. of the Fifth European Meeting on Bacterial Transformation and Transfection 363 - 369 (1981).
- Jentsch, S.: Restriktion und Modifikation in Bacillus subtilis: Charakterisierung verschiedener chromosomaler und phagenkodierter Systeme. Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin (1982).
- Jentsch, S.: Restriction and modification in Bacillus subtilis: Sequence specificities of restrictionmodification systems BsuM, BsuE, and BsuF. J. Bacteriol. 156, 800 - 808 (1983).
- Johnson, C. W., Moran, C. P., Losick, R.: Two RNA polymerase sigma factors from Bacillus subtilis discriminate between overlapping promoters for a developmentally regulated gene. Nature 302, 800 - 804 (1983).

- Kahmann, R.: Methylation regulates the expression of a DNA-modification function encoded by bacteriophage Mu. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 47, 639 - 646 (1982).
- Katz, L., Kingsbury, D. T., Helinski, D. R.: Stimulation by cyclic adenosine monophosphate of plasmid deoxyribonucleic acid replication and catabolite repression of the plasmid deoxyribonucleic acid-protein relaxation complex. J. Bacteriol. 144, 577 - 591 (1973).
- Kiss, A., Baldauf, F.: Molecular cloning and expression in Escherichia coli of two modification methylase genes of Bacillus subtilis. Gene 21, 111 - 119 (1983).
- Korba, B. E., Hays, J. B.: Partially deficient methylation of cytosine in DNA at CC^A_TGG sites stimulates recombination of bacteriophage lambda. Cell 28, 531 - 541 (1982a).
- Korba, B. E., Hays, J. B.: Novel mutations of Escherichia coli that produce recombinogenic lesions in DNA. J. Mol. Biol. 157, 213 - 235 (1982b).
- Kosykh, V. G., Buryanov, Y. I., Bayev, A. A.: Molecular cloning of EcoRII endonuclease and methylase genes. Mol. Gen. Genet. 178, 717 - 718 (1980).
- Krüger, D. H., Bickle, T. A.: Bacteriophage survival: Multiple mechanisms for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction systems of their hosts. Microbiol. Rev. 47, 345 - 360 (1983).
- Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680 - 685 (1970).
- Lark, C.: Effect of the methionine analogs, ethionine and nor-leucine, on DNA sythesis in Escherichia coli 15T⁻. J.

- Mol. Biol. 31, 401 - 414 (1968).
- Lark, C.: Methylation-dependent DNA synthesis in Escherichia coli mediated by DNA polymerase I. J. Bacteriol. 137, 44 - 50 (1979).
- Losick, R., Pero, J.: Cascades of sigma factors. Cell 25, 582 -584 (1981).
- Lu, A.-L., Clark, S., Modrich, P.: Methyl-directed repair of DNA base-pair mismatches in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4639 - 4643 (1983).
- Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., van der Hoek, P., van Alphen, L.: Electrophoretic resolution of the "major outer membrane protein" of Escherichia coli K12 into four bands. FEBS Lett. 58, 254 - 258 (1975).
- Luria, J., Burrous, J. W.: Hybridization between E. coli and Shigella. J. Bacteriol. 74, 461 - 476 (1957).
- Maniatis, T., Fritsch, D. F., Sambrook, J.: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, (1982).
- Mann, M. B., Nagaraja, R., Smith, H. O.: Cloning of restriction and modification genes in E. coli: The HhaI system from Haemophilus haemolyticus. Gene 3, 97 - 112 (1978).
- Mizukami, T., Kawamura, F., Takahashi, H., Saito, H.: A physical map of the genome of the Bacillus subtilis temperate phage rho 11. Gene 11, 157 - 162 (1980).
- Modrich, P., Roberts, R. J.: Typ II restriction and modification enzymes, p. 109 - 154. In Linn, S. M., and Roberts, R. J.(eds): Nucleases. Cold Spring Harbour Labo-

ratory (1982).

- Montenegro, M. A., Pawlek, B., Behrens, B., Trautner, T. A.: Restriction and modification in Bacillus subtilis: Expression of the cloned methyltransferase gene from B. subtilis phage SPR in E. coli and B. subtilis. Mol. Gen. Genet. 189, 17 - 20 (1983).
- Moran, Jr., C. P., Land, N., Leguce, S. F. J., Lee, G., Stephens, M., Sonnenschein, A. L., Pero, J., Losick, R.: Nucleotid sequences that signal the initiation of transcription and translation in B. subtilis. Mol. Gen. Genet. 186, 339 - 346 (1982).
- Noyer-Weidner, M.: Der temperente Bacillus subtilis Phage ϕ 3T codiert für eine BsuR spezifische DNA-Methyltransferase. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München (1980).
- Noyer-Weidner, M., Pawlek, B., Jentsch, S., Günthert, U., Trautner, T. A.: Restriction and modification in Bacillus subtilis: Gene coding for BsuR-specific modification methyltransferase in the temperate bacteriophage ϕ 3T. J. Virol. 38, 1077 - 1080 (1981).
- Noyer-Weidner, M., Jentsch, S., Palwek, B., Günthert, U., Trautner, T. A.: Restriction and modification in Bacillus subtilis: DNA methylation potential of the related bacteriophages Z, SPR, SPB, ϕ 3T and rho 11. J. Virol. 46, 446 - 453 (1983).
- Palefski, S., Hemphill, H. E., Kolenbrander, P. E., Whiteley, H. R.: Dominance relationship in mixedly infected Bacillus subtilis. J. Virol. 9, 594 - 601 (1972).
- Price, A. R., Frabotta, M.: Resistance of bacteriophage PBS2 infection to rifampicin, an inhibitor of Bacillus

- subtilis RNA polymerase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 1578 - 1585 (1972).
- Price, A. R., Hitzemann, R., Frato, J., Lombardi, K.: Rifampicin-resistant bacteriophage PBS2 infection and RNA polymerase in Bacillus subtilis. Nucl. Acids Res. 1, 1497 - 1502 (1974).
- Pukkila, P. J., Peterson, J., Herman, G., Modrich, P., Meselson, M.: Effects of high levels of DNA adenine methylation on methyl-directed mismatch repair in Escherichia coli. Genetics 104, 571 - 582 (1983).
- Ratcliff, S. W., Luh, J., Ganesan, A. T., Behrens, B., Thompson, R., Montenegro, M. A., Morelli, G., Trautner, T. A.: The genome of Bacillus subtilis phage SPP1: The arrangement of restriction endonuclease generated fragments. Mol. Gen. Genet. 168, 165 - 172 (1979).
- Razin, A., Riggs, A. D.: DNA methylation and gene function. Science 210, 604 - 610 (1980).
- Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C., Berg, P.: Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113, 237 - 251 (1977).
- Roberts, R. J.: Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. Nucl. Acids Res. 11, r135 - r167 (1983).
- Rosenberg, M., Court, D.: Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. Ann. Rev. Genet. 13, 319 - 353 (1979).
- Rottländer, E., Trautner, T. A.: Genetic and transfection studies with B. subtilis phage SP50. 1. Phage mutants

with restricted growth on B. subtilis strain 168. Mol. Gen. Genet. 108, 47 - 60 (1970).

Rutberg, L.: Temperate bacteriophages of Bacillus subtilis, p. 247 - 268. In Dubnau, D. (ed.), The Molecular Biology of the Bacilli. Volume I: Bacillus subtilis. Academic Press (1982).

Schoner, B., Kelly, S., Smith, H. O.: The nucleotide sequence of the HhaII restriction and modification genes from Haemophilus haemolyticus. Gene 24, 227 - 236 (1983).

Shibata, T., Ikawa, S., Lomatsu, Y., Ando, T., Saito, H.: Introduction of host-controlled modification and restriction systems of Bacillus subtilis IAM 1247 into Bacillus subtilis 168. J. Bacteriol. 139, 308 - 310 (1979).

Soberon, X., Covarrubias, L., Bolivar, F.: Construction and characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. Gene 9, 287 - 305 (1980).

Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503 - 517 (1975).

Spatz, H. Ch., Trautner, T. A.: One way to do experiments on gene conversion? Mol. Gen. Genet. 109, 84 - 106 (1970).

Spizizen, J.: Transformation of biochemically deficient strains of Bacillus subtilis by deoxyribonucleate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 44, 1072 - 1078 (1958).

Stroynowski, I.: Distribution of bacteriophage ϕ 3T homologous deoxyribonucleic acid sequences in Bacillus subtilis 168, related bacteriophages, and other Bacillus

species. J. Bacteriol. 148, 91 - 100 (1981a).

Stroynowski, I.: Integration of the bacteriophage ϕ 3T-coded thymidylate synthetase gene into the Bacillus subtilis chromosome. J. Bacteriol. 148, 101 - 108 (1981b).

Stüber, D., Bujard, H.: Organization of transcriptional signals in plasmids pBR 322 and pACYC 184. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 167 - 171 (1981).

Szomolanyi, E., Kiss, A., Venetianer, P.: Cloning of the modification methylase gene of Bacillus sphaericus R in Escherichia coli. Gene 10, 219 - 225 (1980).

Theriault, G., Roy, P. H.: Cloning of Pseudomonas plasmid pMG7 and its restriction-modification system in Escherichia coli. Gene 19, 355 - 359 (1982).

Trautner, T. A., Pawlek, B., Bron, S., Anagnostopoulos, C.: Restriction and modification in B. subtilis: Biological aspects. Mol. Gen. Genet. 131, 181 - 191 (1974).

Trautner, T. A., Pawlek, B., Günthert, U., Canosi, U., Jentsch, S., Freund, M.: Restriction and modification in Bacillus subtilis: Identification of a gene in the temperate phage SP8 coding for a BsuR specific modification methyltransferase. Mol. Gen. Genet. 180, 361 - 367 (1980).

Tucker, R. G.: Acquisition of thymidylate synthetase activity by a thymine-requiring mutant of Bacillus subtilis following infection of the temperate phage ϕ 3. J. Gen. Virol. 4, 489 - 504 (1969).

Vogelstein, B., Gillespie, D.: Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 615 - 619 (1979).

- Walder, R. Y., Hartley, J. L., Donelson, J. E., Walder, J. A.: Cloning and expression of the PstI restriction-modification system in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1503 - 1507 (1981).
- Warner, F. D., Kitos, G. A., Romano, M. P., Hemphill, H. E.: Characterization of SPB: a temperate bacteriophage from Bacillus subtilis 168M. Can. J. Microbiol. 23, 45 - 51 (1977).
- Yuan, R.: Structure and mechanism of multifunctional restriction endonucleases. Ann. Rev. Biochem. 50, 285 - 315 (1981).
- Zabeau, M., Breunig, K., Bougueleret, L., Brooks, J., Stirling, V.: Genetic studies of restriction and modification enzymes. EMBL Research Reports, 58 - 63 (1979).
- Zahler, S. A., Korman, R. Z., Rosenthal, R., Hemphill, H. E.: Bacillus subtilis phage SPB: Localization of the prophage attachment site, and specialized transduction. J. Bacteriol. 129, 556 - 558 (1977).
- Zahler, S. A.: Specialized transduction in Bacillus subtilis, p. 269 - 360. In Dubnau, D., (ed.), The Molecular Biology of the Bacilli, Volume I: Bacillus subtilis. Academic Press (1982).

Lebenslauf

31. Mai 1953	Geburt in Hof/Saale
1959-1963	Volksschule in München, Seefeld-Hechendorf und Wien
1963-1964	Besuch des Wasa-Gymnasiums (neusprachlich) in Wien
1964-1972	Besuch des Maximilians-Gymnasiums (humanistisch, altsprachlich) in München
1972	Abitur
1972-1979	Studium der Biologie an der Ludwig- Maximilians-Universität in München, abgeschlossen mit den Prüfungen für das Hauptdiplom
1980	Diplomarbeit "Der temperente <u>Bacillus</u> <u>subtilis</u> Phage ϕ 3T codiert für eine <u>BsuR</u> spezifische DNA Methyltransferase" am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin, unter Anleitung von Professor Dr. T. A. Trautner
Januar 1981	Beginn der Dissertation am Max-Planck- Institut für molekulare Genetik in Berlin, ebenfalls unter Anleitung von Professor Dr. T. A. Trautner

